ISSN 0022-4847

台灣農業研究

第五十六卷 第四期

研究報告

利用水稻稻熱病之罹病葉保存稻熱病菌
謝麗娟、張義璋、陳純葳、謝廷芳 253
受稻熱病菌誘導之水稻表現序列標幟 (EST) 的比較分析
呂秀英、邱怡嘉、陳政道、魏夢麗、呂椿棠 261
應用RAPD技術對荔枝品種遺傳變異性之研究
李文立、鄧永興、林榮貴 281
台灣原生山櫻花 (*Prunus campanulata Maxim.*) 大果種原之選拔
宋家璋、陸明德、歐錫坤 289
砧木種類對茂谷柑植株生長、產量與品質的影響
黃阿賢、洪士程 298
台灣甜瓜白粉病菌*Podosphaera xanthii*的生理小種
黃晉興、王毓華 307
不同栽培基質與覆土材料對雞腿蘑出菇特性之影響
陳錦桐、李瑋崧、吳寬澤 316
以RAPD及SSR分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析及種原鑑定
陳述、范宗宸、林俊義 327

研究簡報

山櫻花之新變型
溫英杰 338
第56卷總目錄 342
第56卷索引 346

中華民國九十六年十二月
行政院農業委員會農業試驗所出版
中華民國 台灣 台中縣 霧峰鄉

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):253-260 (2007)

利用水稻稻熱病之罹病葉保存稻熱病菌[1]

謝麗娟[2] 張義璋[2] 陳純葳[2] 謝廷芳[3,4]

摘　要

謝麗娟、張義璋、陳純葳、謝廷芳。2007。利用水稻稻熱病之罹病葉保存稻熱病菌。台灣農業研究 56:253-260。

本研究評估以罹稻熱病之水稻病葉保存稻熱病菌之可行性。取保存於 4℃下經 0、2、4 及 5 年之稻熱病罹病葉，分別測定以病葉作爲接種源之有效性、罹病葉之總產孢量以及病葉上單病斑之產孢能力。結果顯示以保存達 5 年之病葉供做接種源時仍具致病力，保存 2 年之罹病葉對稻苗具強感染力與剛採集之罹病葉間差異不顯著。保存 5 年之罹病葉經浸水濕潤後隔日之連續 2 天，仍均能持續產孢，保存 2 年和 4 年罹病葉之產孢量，則與剛採集者不具顯著性差異。保存 5 年之罹病葉上的病斑仍具產孢能力，且保存 2 年和 4 年之病斑產孢率仍甚高，與剛採集者差異不顯著。綜合本研究試驗結果，顯示以低溫保存之罹病葉確可供作水稻稻熱病菌之接種源，經 2 年保存之罹病葉仍具良好之致病和產孢能力，與新鮮採集之罹病葉間無顯著性差異。

關鍵詞：水稻、稻熱病、稻熱病菌、罹病葉保存法、接種源。

前　言

長久以來，水稻稻熱病之抗病育種工作就一直受到重視，但因稻熱病菌 (*Pyricularia oryzae* Cavara，有性世代爲 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.) 之變異性極大，致使稻熱病之抗病檢定工作變得複雜。短期間內欲精確地大量檢定各稻品種系之抗感病性，必須提供適合且一致之發病環境，包括利用溫室人工接種和田間自然發病方式 (Ou 1985)。依據 Ou (1985) 之記載人工接種法多以人工培養菌製成孢子懸浮液，再噴霧接種於植體上。但吾等經驗，稻熱病菌在培養基上之產孢能力不穩定，難以製作大量接種源，測定之菌株及稻品種系之數量均甚有限。另外，田間稻熱病菌的生理小種多，若只以少數菌株接種，並不足以代表田間多數菌株族群之變化，勢難以篩選出抗病幅度較廣之品種。田間自然感病之抗病檢定方式分爲苗期檢定和本田期檢定。台灣早期多採本田期檢定，由水田式病圃淘汰罹病個體，Yang (1967) 指出此法因受氣候及環境因素影響，常有發病不均或不發病之現象，且費時費工，試驗設立苗期旱田稻熱病檢定圃。Ou (1985) 歸納苗期檢定適合發病之環境因子，以旱地苗圃較水秧田病圃爲佳；須施重氮肥和維持高濕度，如每天以水噴霧 2 或 3 次；且於平均氣溫 24-28℃之天候進行較適宜，而乾燥季節可先於傍晚噴水，再於夜間覆蓋塑膠布製造露水 (IRRI 1977; Ou 1985)。Ou (1963) 提出以條播栽植增加濕度，並據以建立國際統一稻熱病圃模式 (Ou 1965)。台灣嘉義分所亦採旱田病圃檢定，藉噴水保濕方式，促使田間自然發病 (Yang

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2300 號。接受日期：96 年 10 月 13 日。
2. 本所植物病理組技佐、前副研究員、約聘人員。台灣　台中縣　霧峰鄉。
3. 本所花卉研究中心研究員兼主任。台灣　雲林縣　古坑鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：tfhsieh@wufeng.tari.gov.tw；傳真：(05)5820835。

1967)。1981 年，農業試驗所霧峰總所亦於旱田病圃上利用塑膠布覆蓋保濕，創造有利發病條件，增進抗感病檢定之效果。另外，再考慮菌株區域性分布的問題，遂委請各地區農業改良場採集當地水稻罹病葉，做為旱田檢定圃之接種源，並覆蓋塑膠布，檢定結果良好。採用這種病葉接種法至今已有 20 餘年之經驗，但稻熱病害並非每年均嚴重發生，常常無法提供足量接種源，因此本研究的目的即希望藉由罹病葉之保存，來持續性地提供有效接種源。

材料與方法

供試稻熱病菌與水稻

於本所農場試驗田建立旱田病圃，分別於 2001、2002、2004 和 2006 年之 3、4 月間，撒播台農 67 號稻苗圃，讓其自然發病，俟生長至 4 至 5 葉片，且罹病病斑面積率達 20-25%時，採集罹病株，俟陰乾後以報紙包裹，裝入塑膠袋內，置 4℃冰箱冷藏保存。至 2006 年 5 月止，保存期限共計達 5、4、2 和 0 年。本研究分別由保存 5、4、2 年及當年剛採集之罹病株作為供試材料，各取 10 和 50 株病株之罹病葉當供試接種源。

2006 年 5 月間，於溫室中栽植台農 67 號稻苗，以 4×4×5 cm^3 之小塑膠盒播種，每小盒點播 10 顆，俟生長至 4 至 5 葉片稻齡時供接種。

不同保存期罹病葉作為接種源之致病力

接種時以上述 4 個保存期罹病葉，各取 10 和 50 株罹病株作為接種源。先將供試罹病葉浸水 4 hrs 使葉面伸展開後，再於傍晚分別懸掛於 4 至 5 葉齡期之水稻台農 67 號稻苗葉上方距 30 cm 處。每處理懸掛接種 9 小盒，設有 3 重複。並以透明塑膠袋包覆保濕，翌晨約經 17 hrs 後掀開，傍晚時再覆蓋保濕，如此反覆處理 3 天，經一週後調查各處理稻苗之罹病株率和罹病度。

不同保存期罹病葉上病原菌之產孢量

取上述 4 個保存期之病葉，各取 10 和 50 株罹病株，如上述方法亦先浸水 4 hrs 後，並以自來水沖洗各罹病葉病斑上老舊孢子，再於傍晚置於塑膠袋內保濕使重新產孢，翌晨經 17 hrs 後，以 100 mL 無菌水洗出孢子，並以血球計數器計數其孢子數，再換算 1 mL 水之孢子量。當日傍晚將各處理病葉再置塑膠袋內，翌晨亦以 100 mL 無菌水洗出孢子，並計數其孢子量。各處理設 3 重覆。

不同保存期罹病葉病斑上病原菌之產孢能力

分別剪取上述 4 個保存期罹病葉上之單病斑各約 50 個，先以 1%次氯酸鈉 ($NaOCl_3$) 消毒 1 分鐘後，以無菌水漂洗三次，移置於 2% (W/V) 水瓊脂 (Water Agar) 平板上，於室溫下放置二週後，以解剖顯微鏡鏡檢並分別記錄 4 個保存期之各 50 個病斑之產孢與否，再換算成產孢率。產孢率 (%) =（可產孢之病斑數／總檢查病斑數）× 100%。

病害調查方法

罹病株率係以罹病株數佔總接種株數之百分率在 1/3 以下者訂為 1 級，1/3-2/3 為 2 級，2/3 以上為 3 級。罹病度係依 IRRI 菲律賓稻米研究所所訂罹病病斑面積佔全葉總面積之百分率為其判定依據，未發現病斑者為 0 級，罹病面積率在 1%以下者訂為 1 級，1-5%為 3 級，6-25%為 5 級，26-50%為 7 級，51-100%為 9 級 (International Rice Testing Program 1980)。

結　果

不同保存期罹病葉作為接種源之致病力

由四個保存期 5、4、2 和 0 年，且分 10 和 50 病株病葉等二種接種量分別接種稻苗之結果顯示，各處理之平均罹病株率，以保存 2 年之 50 病株處理者之 1.6 為最高。其中以 10 病株接種量處理時，稻苗罹病株率不受接種源罹病葉之保存期影響，即其間差異不顯著；而以 50 病株接種量處理時，以保存 0 年和 2 年罹病葉接種之稻苗罹病株率較高，且差異不顯著。另外，以 10 和 50 病株接種量處理時，其 5、4、2 和 0 年保存期接種之平均罹病度，分別為 0.7、0.9、1.9、2.3 及 0.9、1.2、2.4、2.7。其中均以保存 0 年和 2 年之罹病度較高且兩者之間不具顯著差異（表 1）。顯示保存達 5 年之罹病葉仍具致病力，其中已保存 2 年之罹病葉的致病力仍甚強，與剛採集者之間差異不顯著。

不同保存期罹病葉上病原菌之產孢量

取分別保存 5、4、2 和 0 年之罹病葉各 10 和 50 個病株，經水洗後使重新產孢，結果由二次水洗之平均產孢量，分別為 6、77、161、69 和 26、165、174、239 conidia /1 mL，均以 50 個病株之平均產孢量高於 10 個病株者。比較 4 個保存期之罹病葉產孢量，除以 50 個病株量經第二次水洗處理者，各個保存期之間無差異外，其餘以 50 個病株經第一次水洗和以 10 個病株經兩次水洗處理時，產孢量皆以保存 0 年、2 年和 4 年者為較高，且其間無顯著差異。另外，觀察第一次水洗和第二次水洗後隔天之產孢情形，發現經連續 2 天水洗後的罹病葉均能持續產孢，尤其以剛採集保存 0 年之 50 株處理者，第二次水洗後之產孢量 312 個為最多，約為第一次水洗後之產孢量（166 個）的 2 倍。比較經兩次水洗後罹病葉之產孢量，除以 50 個病株保存 5 年之罹病葉，以第一次水洗較第二次高者外，其餘各處理之兩次水洗間之產孢量均無顯著性差異存在（表 2）。

表 1. 不同保存期之稻熱病罹病葉作接種源接種稻苗後稻熱病之發生情形

Table 1. The comparison of disease index and severity of rice blast on seedlings inoculated with *Pyricularia oryzae* infecting rice plants after storing for different periods of time

Preservation period (year)	No. of diseased plants as inoculum							
	10				50			
	Disease index [z]		Severity [y]		Disease index		Severity	
	Average	Range	Average	Range	Average	Range	Average	Range
0	1.0° a[x]	0-3°	2.3 a	0-6°	1.0° ab	0-3°	2.7 a	0-6°
2	1.2° a	0-3°	1.9 ab	0-6°	1.6° a	0-3°	2.4 a	0-6°
4	0.8° a	0-3°	0.9 b	0-5°	0.7° b	0-2°	1.2 b	0-5°
5	0.5° a	0-2°	0.7 b	0-3°	0.6° b	0-3°	0.9 b	0-5°

[z] Disease index is expressed as three scales: 1° = less than 1/3 plants infected; 2° = 1/3-2/3 infected; 3° = more than 2/3 infected. Data were recorded one week after inoculation.

[y] Disease severity is expressed as nine scales: 0 = no symptoms, 1 = less than 1%; 3 = 1-2%; 5 = 3-10%; 6 = 11-25%; 7 = 26-50%; 8 = 51-75%; 9 = more than 75% of leaf areas infected. Data were recorded one week after inoculation.

[x] Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at $P = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

不同保存期罹病葉病斑上病原菌之產孢能力

測定保存達 5、4、2 和 0 年之罹病葉上單病斑之平均可產孢率，各為 47.9、76.1、92.3 和 93.0%，以病葉保存 0 年、2 年和 4 年罹病葉之病斑可產孢率較高且差異不顯著（表 3），顯示病斑保存 5 年仍具產孢能力，惟可產孢率明顯下降；已保存 2 年和 4 年罹病葉之病斑可產孢率甚高，與剛採集之罹病葉之間無顯著性差異存在。

討　論

稻熱病屬世界重要之水稻流行病害，一旦大發生，即造成嚴重的產量損失。對農民而言，較經濟有效的防治方法為種植抗病品種，新育出之抗病品種在推廣幾年後，容易失去其抗性而罹病化，有學者認為抗病品種之罹病化與稻熱病菌複雜多變的生理型有關 (Ou 1985; Wu 1978; Chien *et al.* 1989)。稻熱病菌的生理分化問題最早由 Sasaki (1922, 1923) 提出，隨後各稻米生產國家也陸續研究報告，並各自訂定出判別品種作為其國內稻熱病菌生理小種分類之依據 (Hung *et al.* 1961; Ahn & Chung 1962; Goto *et al.* 1967; IRRI. 1964; Latterell *et al.* 1965)，國際稻米研究所更經過多次檢討

表 2. 比較不同保存期稻熱病罹病葉上病原菌之產孢量

Table 2. Comparison of sporulation amount of *Pyricularia oryzae* on blast diseased leaves after preserving different periods of time

Preservation period (year)	Sporulation (spore/mL)					
	10 diseased plants			50 diseased plants		
	I	II	Average	I	II	Average
0	78 ab A[z]	60 ab A	69	166 ab A	312 a A	239
2	196 a A	126 a A	161	200 ab A	148 a A	174
4	66 ab A	88 ab A	77	260 a A	70 a A	165
5	0 b A	12 b A	6	40 b A	12 a B	26

[z] Means in a column followed by the same lowercase letters and in a raw followed by the same uppercase letters, respectively, are not significantly different at $P = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

表 3. 不同保存期稻熱病罹病葉之單一病斑上病原菌之可產孢率 (%)

Table 3. Percentage of sporulated lesions on blast diseased leaves after storing at 4℃ for different periods of time

Preservation period (years)	Sporulated lesions (%)[z]		
	I[y]	II	Average
0	98.2	87.7	93.0 a[x]
2	86.3	98.2	92.3 a
4	69.2	83.0	76.1 a
5	48.9	46.9	47.9 b

[z] Sporulated lesions (%) ＝ (no. of sporulated lesions / no. of total observed lesions) × 100%

[y] No. of trials.

[x] Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

會，選拔出 8 個水稻品種作爲國際判別品種 (Yamasaki & Takasaka 1980; Goto *et al.* 1967; Ling & Ou 1969)。報告指出在同一田區同一品種水稻上存在有各種不同的生理小種 (Chien 1967)，且在不同年度各地區各生理小種出現的頻度亦不相同 (Chien 1969, 1978)，甚至同一病斑上可分離得到分屬不同生理小種的單孢菌株 (Chien 1968; Ou & Ayad 1968)，研究學者均建議選拔抗病品種時應選擇當地優勢生理小種作爲接種源。但只使用幾種當時的稻熱病菌優勢小種來篩選抗病品種，往往於品種推廣大面積種植後隨即失去其抗病性。Yamasaki & Takasaka (1980) 及 Yamanaka & Yamaguchi (1987) 等指出，抗稻熱病品種之罹病化受稻熱病菌變異之影響最大，由於新抗病品種推廣致使原優勢生理小種無法爲害，因而使得新的生理小種、外來生理小種，或本來較弱勢的生理小種隨即出現並增加其密度比例，並隨著該品種種植面積增加逐漸成爲優勢生理小種。Chien (1989) 等人的實驗亦得到相同的結果，抗稻熱病品種的台農 70 號自 1985 年推出後，廣受歡迎，栽種面積急速擴大，1987 年隨即罹病化。此外，Ou (1971) 認爲一菌系內的眾多菌株，在判別品種上的反應雖然相同，但對判別品種以外的品種反應很可能不同，所以小種的判別結果，視所用的判別品種數而定，如果接種時只用特定菌株代表一菌系容易造成結果誤判，例如 Tu & Chang (1992) 指出除 16 個判別品種外，增加台農 70 號與台南 9 號 2 個水稻品種，接種 168 個稻熱病菌株，會使原本 5 個生理小種變成 15 個。Ou (1985) 提倡田間抗性品種篩選，必須要將待測水稻植株暴露在當地所有生理小種皆存在的地區。然而，將所有生理小種製成孢子懸浮液，並以人工接種方式篩選既費時又費力，且這些菌株在繼代培養中的病原性會有逐漸遞減的趨勢 (Chien 1968) 與變異的風險 (Chien 1969)；另外，由於台灣地理環境與田間栽培品種混雜，稻熱病菌生理型之變化更爲複雜。本所爲創作台灣所有生理小種皆存在的環境，以選拔出較優良的抗病品種，將各地採集之罹病葉一起作爲旱田檢定圃之接種源，近 20 餘年來之檢定結果成效良好。然而，稻熱病並非每年均嚴重發生，無法持續供應足量接種源，因此希望藉由新鮮病葉之保存，以作爲持續供應有效接種源之法，本研究結果證明本法確具可行性。

本研究探討以罹病葉保存稻熱病菌，取經 5、4、2 和 0 年等四個不同時期之稻熱病罹病葉，分別測定以罹病葉作爲接種源接種稻苗之致病力，罹病葉之產孢量，以及罹病葉上各單一病斑之產孢能力。結果顯示保存達 5 年之罹病葉作爲接種源時仍具致病能力，而經保存 2 年之罹病葉的致病力仍甚強，與剛採集者無顯著性差異；保存 5 年之罹病葉經水洗後連續 2 天均能持續產孢，以保存 2 年和 4 年之罹病葉的產孢量與剛採集者較高，且無顯著性差異；另外，發現保存 5 年之罹病葉上的單一病斑仍具產孢能力，尤其以保存 2 年和 4 年罹病葉上之病斑的可產孢率仍甚高，與剛採集者之單病斑可產孢率間無顯著性差異。綜合本試驗結果，證實以冷藏保存稻熱病罹病葉作爲接種源之可行性，且發現罹病葉經冷藏保存 2 年仍具良好之致病與產孢能力，與新鮮採集之罹病葉間無顯著差異性存在。

在近一、二十年來，水稻稻熱病之抗病檢定，農業試驗所總所都以罹病葉作爲稻熱病菌接種源進行接種，即以台灣各地所採集之罹病葉片先接種於健康秧苗，製作大量罹病葉後再行採集提供爲接種源之用。多年檢定之結果相當一致與穩定，不但可節省勞力，更可避免以單一或少數菌株接種之缺失，抗感病品種系發病均勻，抗感病性表現差異明顯，所篩選出之稻品種系，多能抗台灣各地稻熱病菌菌株族群，抗病幅度廣且田間之抗病性亦較穩定。本研究再利用 4℃冷藏保存罹病葉以供作稻熱病菌之接種源，使能持續性地提供接種之用。由試驗期間產生之罹病葉，均可利用本法收集保存以作爲往後之接種源材料，此確爲既實用又簡便之保存法。據此，雖無植物病理專業技術之抗病育種人員，亦得以依本法既便利又有效率地從事抗病檢定或篩選工作。

引用文獻 (Literature cited)

Ahn, C. J., and H. S. Chung. 1962. Studies on the physiological race of rice blast fungus, *Piricularia oryzae*, in Korea. Seoul University Journal, Biology and Agriculture (D). 11:77-83. (in Korean with English abstract)

Atkins, J. G., Alice L. Robert, C. R. Adair, K. Goto, T. Kozaka, M. Yamada, P. Yanagita, and S. Matsumoto. 1967. An international set of rice varieties for differentiating races of *Piricularia oryzae*. Phytopathology 57:297-301.

Chien, C. C. 1967. Studies on the Physiological Races of the Rice Blast Fungus, *Piricularia oryzae* Cav. Bull. Taiwan Agric. Res. Inst. Special. Pub. No. 26. 63 pp. (in Chinese)

Chien, C. C. 1968. Studies on the pathogenicity of the different monocultures of *Piricularia oryzae* Cav. Isolated from a single blast lesion. Agric. Res. 17:22-29. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. 1969. Variation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. p.11-30. *in*:Rice Diseases. (Chiu, R. J. ed.) Joint Commission on Rural Reconstruction Pub. Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. 1978. Levels of host in relation to the incidence of rice blast. p.225-245. *in*: Diseases and Insect Pests of Rice: Ecology and Epidemiology. (Chiu, R. J. ed.) Joint Commission on Rural Reconstruction Pub. Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., L. C. Hsieh, and Y. C. Chang. 1989. Studies on the break-down of resistance in rice cultivar Tainung 70 to rice blast. J. Agric. Res. China 38:72-79. (in Chinese with English abstract)

Goto, K., T. Kozakz, K. Yanagita, M. Yamada, S. Matsumoto, K. Shindo, J. G. Atkins, A. L. Robert, and C. R. Adair. 1967. U.S.-Japan cooperative research on the international pathogenic races of the rice blast fungus, *Piricularia oryzae* Cav. and their international differentials. Phytopathol. Soc. Jpn. 33(Extra Issue):1-87.

Hung, C. H., C. C. Chien, and S. Y. Lin. 1961. Study on the physiological races of *Piricularia oryzae* Cav. Agric. Res. 10:27-34.

Intermational Rice Research Institute. 1964. Study of the pathogenic race in the Philippines. p.131-136. *in*:1964 Annual Report of the IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines.

International Rice Research Institute. 1977. Annual Reports of IRRI for 1964-79.

International Rice Testing Program. 1980. Standard Evaluation System for Rice. 2nd ed. IRRI, Philippines, 44 pp.

Latterell, F. M., M. A. Marchetti, and B. R. Grove. 1965. Coordination of effort to establish an international system for race indentification in *Piricularia oryzae*. p.257-274. *in*: The Rice Blast Disease. Johns Hopkins Press. Baltimore, Maryland, USA.

Ling, K. C., and S. H. Ou. 1969. Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae* Cav. Phytopathology 59:339-342.

Ou, S. H. 1963. Rice blast disease and breeding for its resistance in Thailand, with notes on other rice disease. FAO Expanded Technical Assistance Program Report No. 1673. 26 pp.

Ou, S. H. 1965. A proposal for an international program of research on the rice blast disease. p.441-446. *in*: The Rice Blast Disease. The Johns Hopkins Press. Baltimore, Maryland.

Ou, S. H. 1971. A new approach to rice breeding for blast disease resistance. p.31-48. *in*: Rice Diseases. (Chiu, R. J. ed.) Joint Commission on Rural Reconstruction Pub. Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Ou, S. H. 1985. Blast. p.109-201 *in*: Rice Diseases 2nd ed. (Ou, S. H.ed.). Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 380 pp.

Ou, S. H., and M. R. Ayad. 1968. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. Phytopathology 58:179-182

Sasaki, R. 1922. Existence of strains in rice blast fungus. I. J. Plant Prot. Tokyo 9:631-644. (in Japanese)

Sasaki, R. 1923. Existence of strains in rice blast fungus. II. J. Plant Prot. Tokyo10:1-10. (in Japanese)

Tu, C. C., and Y. C. Chang. 1992. Plant breeding for disease resistance. p.233-250. *in*: The Proceedings of Symposium on Non-Chemical Control of Plant Pests and Diseases. The Plant Protection Society of the Republic of China Pub. Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Wu, H. K. 1978. Types of resistance to rice blast disease. p.213-224. *in*: Disease and Insect Pests of Rice: Ecology and Epidemiology. (Chiu, R. J. ed.) Joint Commission on Rural Reconstruction Pub. Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Yamanaka, T., and T. Yamaguchi. 1987. Rice Blast Disease. Yokendo. Japan. (in Japanese)

Yamasaki, Y., and J. Takasaka. 1980. Rice Blast Disease and Breeding of Resistant Cultivars. Hakuyuusya Press. Tokyo. Japan. 599 pp. (in Japanese)

Yang, S. C. 1967. The use of non-irrigated nursery for breeding blast resistance of rice. J. Taiwan Agric. Res. 16(3):1-7. (in Chinese with English abstract)

Use of Rice Blast Diseased Leaves for Preservation of *Pyricularia oryzae*[1]

Lih-Jiuan Hsieh[2], Yih-Chang Chang[2], Chun-Wei Chen[2] and Ting-Fang Hsieh[3,4]

Abstract

Hsieh, L. J., Y. C. Chang, C. W. Chen, and T. F. Hsieh. 2007. Use of rice blast diseased leaves for preservation of *Pyricularia oryzae*. J. Taiwan Agric. Res. 56:253-260.

The objective of this study was to evaluate the potential for using rice blast diseased leaves to preserve *Pyricularia oryzae*. Fresh detached blast diseased leaves and leaves stored at 4℃ for 2, 4 and 5 years were used as the inoculum sources to infect rice seedlings. They were also used to determine the amount of pathogen spores produced on diseased leaves, and the sporulated percentage of the observed lesions. The results showed that after 5-year storage the diseased leaves were still capable of initiating rice blast on rice seedlings. The diseased leaves stored for 2-year had a higher infectivity than those stored for 4 or 5 year, but had no significant difference in infectivity with those on fresh leaves. After soaking in water for 4 hours, the diseased leaves stored for 5 years sporulated continuously for 2 days. The amounts of pathogen spores produced on fresh diseased leaves and leaves stored for 2 or 4 years were not significantly different. The lesions from diseased leaves stored for 5 years were still able to sporulate. The lesions on diseased leaves stored for 2 or 4 years had higher percentage of sporulation than those stored for 5 years, and this ability to sporulate was not significantly different from those on fresh leaves. Our result showed that it is feasible to use diseased leaves stored at 4℃ for more than 2 years as the source of inoculum of *P. oryzae*.

Key words: Rice, Rice blast, *Pyricularia oryzae*, Blast-disease-leaf preservation method, Inoculum source.

---

1. Contribution No.2300 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: October 13, 2007.
2. Respectively, Research Assistant, Former Associate Researcher and Contract Employee, Plant Pathology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Senior Researcher and Director, Floriculture Research Center, ARI, KuKeng, YunLin, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail:tfhsieh@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(05)5820835.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):261-280 (2007)

受稻熱病菌誘導之水稻表現序列標幟 (EST) 的比較分析[1]

呂秀英[2,4] 邱怡嘉[3] 陳政道[2] 魏夢麗[2] 呂椿棠[2]

摘　要

呂秀英、邱怡嘉、陳政道、魏夢麗、呂椿棠。2007。受稻熱病菌誘導之水稻表現序列標幟 (EST) 的比較分析。台灣農業研究 56:261-280。

稻熱病由真菌 (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr) 所引起，是嚴重影響水稻 (*Oryza sativa* L.) 生產的世界性重要病害。表現序列標幟 (expressed sequence tag, EST) 是 cDNA 序列片段，直接研究 EST 可獲取基因表現訊息。為探討水稻不同品種於不同植株部位、不同發育時期感染稻熱病之不同功能基因的表現差異特性，本研究擷取 NCBI 的 dbEST 資料庫中不同水稻品種、植株部位及發育時期的受稻熱病菌誘導之水稻 EST 資料，共 14 個 cDNA 基因庫，就各基因庫分別進行 EST 的功能註解、分類和表現量統計，並藉由集群分析和對應分析檢測不同基因庫間之基因表現型式的差異性及表現基因的功能類別。結果顯示，野生稻受稻熱病菌侵染後，代謝、細胞生長和形態發生、次細胞定位和傳輸促進作用等相關功能的基因表現量，高於秈稻和稉稻；水稻葉片在不同生長階段中感染稻熱病，其表現出的能量和代謝功能之基因表現量以成熟期為最高，其次為分蘗期，苗期則最低；受稻熱病菌誘導的水稻 EST 序列若混合了不同品種及不同部位組織，與使用單一品種及固定部位組織在基因表現上有明顯差異。這些發現，可提供了解水稻對稻熱病防禦機制的參考。

關鍵詞： 水稻、稻熱病、表現序列標幟、功能註解及分類、基因表現量統計、集群分析、對應分析。

前　言

廣泛應用資料庫中的表現序列標幟 (expressed sequence tag, EST)，可用來探討不同組織的基因表現 (Adams *et al.* 1991; Rudd 2003; Wei *et al.* 2005a, b)。EST 是將某特定生長發育期或某特定生理狀態下之組織所表現的訊息 RNA (messenger RNA, mRNA) 經反轉錄酶 (reverse transcriptase) 產生互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 後，自其 5' 端進行定序所得到的序列稱之，通常長度是 200-500 bp (Adams *et al.* 1991)。EST 雖然只是 cDNA 的片段序列，但具快速且低廉的優點，故成為連接結構基因組學和功能基因組學的一道橋樑，進行 EST 分析可提供基因辨識、新基因發現及基因表現差異性等研究，是最快速獲得序列資訊及提供功能性基因組研究之來源 (Adams *et al.* 1991,

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2301 號。接受日期：96 年 11 月 29 日。
2. 本所作物組研究員、計畫助理、助理研究員及助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 私立朝陽科技大學生物技術研究所碩士。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：iying@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23390528。

1992; Polymeropoulos 1993; Bonaldo *et al.* 1996; Rounsley *et al.* 1996; Ewing *et al.* 1999; Jongeneel 2000; Kantety *et al.* 2002; Rudd 2003; Wei *et al.* 2005a, b)。隨著「國際水稻基因組定序計畫」(IRGSP) 於 2002 年 12 月宣佈水稻 (*Oryza sativa* L.) 基因組定序草圖完成 (Feng *et al.* 2002; Sasaki *et al.* 2002; Tyagi *et al.* 2004; IRGSP 2005)，對水稻功能基因組的研究準確度將有大幅提昇 (Wei *et al.* 2005a)。針對水稻受病蟲害或逆境誘導之 EST 進行功能註解 (functional annotation)，將有助於瞭解水稻對病蟲害、逆境壓力之防禦機制的研究。

稻熱病（古稱稻瘟），由真菌 (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr) 所引起，是影響水稻生產最嚴重的世界性真菌性病害 (Liu *et al*. 1981; Liang 2005)。根據研究報告指出，1975 至 1990 年間因稻熱病所導致的全球稻作糧食損失平均每年高達約一千萬噸 (Baker *et al.* 1997)。稻熱病自水稻秧苗期至成熟期之整個生長發育時期及稻株各個部位（苗、葉、葉舌、節、穗）皆會被感染發病，病徵因各部位發病的病徵稍有差異，一般病徵爲發病初期先於葉面上形成褐色或暗綠色小斑點，如環境適合，擴大成紡錘形，此時病斑周圍呈黃色，中間赤褐色，內部灰白色；嚴重時葉片枯萎甚至全株枯死。稻熱病菌遺傳上的多樣性和複雜性是稻熱病廣泛流行的主要原因，目前生產上對稻熱病的防治並無特效的方法，多是依賴水稻品種自身的抗性來抵禦病害的發生，因此稻熱病抗性的遺傳和育種研究就具有十分重要的意義 (Liang 2005)。目前國內外在基因層次對稻熱病的抗病機制研究上，多集中在抗病基因的鑑定和選殖上，但對於水稻防禦稻熱病菌侵染的基因表現差異，迄今相關研究仍相當有限。例如 Rauyaree *et al.* (2001) 以稻熱病菌感染 48 小時的水稻葉片組織 EST，經過聚集 (clustering) 及接合 (assembly) 之常規化處理以減少多餘性 (redundancy) 後所產生的接合序列 (contig 或 consensus sequence)，經由資料庫比對進行功能註解及分類，結果得知以表現逆境防禦反應之基因量最多 (21%)，其他則是參與代謝、蛋白質合成、細胞訊息傳遞等相關功能的基因，但也有 19%尚未清楚是何種功能基因。Jantasuriyarat *et al.* (2005) 利用抗病、部分抗病及感病之不同來源的水稻葉片組織 EST，檢測其接種稻熱病菌 6 及 24 小時後的基因功能表現，透過 EOG (Eukaryotic Orthologous Group) 進行功能註解及分類，發現其中只有 42%可推測出其功能基因，而且防禦、訊息傳遞機制、細胞循環控制、細胞分裂等相關功能的基因表現量會增加，以抵抗病原菌之侵害。

植物與病原相互作用的過程中一般涉及病原與宿主間的相互識別、訊號傳導、植物抗性基因活化等一系列的生理生化反應，從不同水稻品種於不同植株部位、不同發育時期感染稻熱病之基因表現差異的角度進行研究，結合 EST 的生物資訊學分析，以獲取基因表現豐富度的變化數據，可更有助於了解水稻受稻熱病菌侵染後水稻防禦反應體系的構成狀況。至 2007 年 7 月 31 日止，登錄在 NCBI 的 dbEST 資料庫中的水稻 EST 序列數量已累積近 1,270,889 萬條，其中水稻受重要病蟲害所誘導之 EST 中以受稻熱病菌誘導之序列資料爲最多，高達 84,705 條。因此，本研究從 dbEST 資料庫中擷取受稻熱病菌誘導之水稻 EST 資料，篩選出定序材料分別取自不同品種於不同植株部位、不同發育時期的水稻組織，共 14 個 cDNA 基因庫，進行基因功能的註解、分類及表現量統計，然後利用集群分析 (clustering analysis) 及對應分析 (correspondence analysis) 之多變數統計技術 (multivariate analysis)，以探討水稻不同品種於不同植株部位、不同發育時期感染稻熱病之不同功能基因的表現差異特性。

材料與方法

試驗材料

本研究擷取 NCBI 之 dbEST 資料庫中受稻熱病菌誘導所產生之 84,705 條水稻 EST 序列，依登錄時間由遠至近排序，分屬於 14 個 cDNA 基因庫，本研究各以 BF-1、BI-2、BI-1、BM-2、BM-1、AF、BQ、BU、CBir36、CBbare、BF-2、CD、CX 及 DN 之 14 個代號來表示，並下載儲存於不同的 FASTA 格式之序列檔案，其相關資訊整理如表 1。這些 EST 分別取自於不同品種（包含野生種）、不同植株部位及不同發育時期的水稻組織，序列長度介於 48-1,733 bp 之間，提供來源者包括中國大陸、美國、韓國及印度等不同國家。

EST 的聚集與接合

由於不同的基因所表現的 mRNA 量不同，選殖時表現量多的基因較容易被選殖出來且產生較多數 EST 序列，表現量少的基因則較不易獲得 EST 序列。然而由於 EST 序列是隨機取樣之各轉錄

表 1. NCBI 之 dbEST 資料庫中受稻熱病菌誘導之水稻 EST 的資訊摘要（至 2007/7/31 止）

Table 1. Information summary of rice ESTs induced by *Magnaporthe grisea* from NCBI-dbEST database (update time: July 31, 2007)

Genbank Acc.	File name	EST no.	Entry creatry	Length (bp)	Variety^z	Tissue	Developmental stage	Country
BF889457-BF889486	BF-1	14	2001/5/1	173-577	Drew (japonica)	leaf	16-day-old seedling	USA
BI118615-BI118864	BI-2	250	2001/6/26	152-1175	Yuanfeengzao (indica)	leaf	3 week seedling	USA
BI807369-BI811654, BI811655-BI813841	BI-1	6437	2001/10/2 2001/11/1	146-860	*Oryza sativa*	leaf	mature stage	China
BM037978-BM039065	BM-2	1088	2001/11/6	60-1086	*O. sativa*	leaf	mature stage	China
BM418528-BM422311	BM-1	3784	2002/1/28	169-1045	*O. sativa*	leaf	mature stage	China
AF521978-AF522023	AF	46	2002/7/30	60-600	Bianyiyuexiangzhan (indica)	leaf	seedling five leaf stage	China
BQ905903-BQ909262	BQ	3360	2002/8/19	58-800	*O. sativa*	leaf	mature stage	China
BU666934-BU667367	BU	434	2002/9/30	48-788	*O. sativa*	leaf	mature stage	China
CB617709-CB635999	CBir36	18241	2003/4/8	159-979	IR36 (japonica)	leaf	3 week seedling	USA
CB636000-CB686047	CBbare	49403	2003/4/8-9	152-973	Nipponbare (japonica)	leaf	3 week seedling	USA
BF145163-BF145216, BF108309-BF108365	BF-2	111	2003/12/30	115-798	Minghui 63 (indica)	14 different tissues		China
CD347671-CD347779	CD	109	2004/3/5	62-815	*Oryza minuta* 101144 (wild)	leaf	Vegetative stage	Korea
CX727819-CX728959	CX	1141	2005/1/21	152-686	Nipponbare (japonica) IR 36 (japonica)	leaf	3 week seedling	USA
DN475717-DN475431	DN	287	2005/3/9	143-1733	*O. s ativa* (indica cultivar-grop)	13 different tissues		Indica
Total		84705		48-1733				

^{z} *O. sativa*: variety name wasn't described by submitter.

產物 mRNA，表現量多的 EST 定序可能具有較高的重複性而導致產生多餘序列，故可能會有多個 EST 代表同一個轉錄產物。因此在進行 EST 分析之前，為維持序列的品質，通常都會運用聚集與接合的方法，減少 EST 的重疊性，並將其連接成更長、更高質量的序列。這種分析之前的常規化處理對 EST 功能的識別、剪接產物的區分和基因表達圖譜的分析都有很大的幫助，進而有利於功能註解之進行 (Adams *et al.* 1995)。聚集之目的就是將來自於同一個基因之具有重疊部分的 EST 歸至單一的群 (cluster)，而無法歸群者則單獨成群，如此可建立一個非多餘性的序列資料庫 (Kohchi *et al.* 1995; Bonaldo *et al.* 1996)；然後透過接合，即將同一群內的多個序列，經由剪切 (clip) 5' 和 3' 端之低品質區域並計算讀取間的重疊性，再依重疊計分由大到小依序將讀取序列連結成較長的接合序列。EST 經過聚集與接合所得的單獨成群之序列和接合序列，都屬於彼此之間沒有重疊的單一序列。本研究使用 CAP3 序列接合程式 (Huang & Madan 1999)，對受稻熱病菌誘導之水稻 EST 序列，分別以分開不同 cDNA 基因庫來進行聚集及接合，然後再以所得的單一序列，進行後續的基因功能比較分析。

EST 單一序列之功能的註解、分類及表現量統計

Chiu *et al.* (2007) 以受褐飛蝨誘導之水稻 EST 資料為材料，成功建立了一套完整的 EST 功能分析流程，可快速進行 EST 功能的註解、分類及表現量統計：(1) 首先去比對 TIGR Gene Index (TGI) 資料庫 (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi)，以進行功能註解；(2) 藉由搜尋結果連結至相對應之 GO (http://www.geneontology.org/) 分類代碼及敘述，可進行功能註解之粗分類；(3) 再經由 GO 分類代碼連結至相對應之 MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences; http://mips.gsf.de/) 分類代碼目錄，以進行功能註解之細分類；(4) 最後計算各類功能類別的個數統計及百分比計算。TGI 蒐集的基因資料不僅是簡單地對 NCBI 之 GenBank 資料庫的基因和 EST 數據按物種分類，也提取 GenBank 中不同物種的 EST 和註解的基因序列，並通過聚集、接合等分析過程產生單一的、具有高可信度的假設性一致序列 (tentative consensus sequence, TC)，此 TC 可用來提供推測基因之功能註解。GO 主要提供結構及動態模式的控制字彙和分類系統，真核生物的基因和蛋白質也可透過 GO 的整合性分類系統得到分子功能 (molecular function)、生物程序 (biological process)、細胞成分 (cellular component) 三個層次的註解，可對基因組資訊進行簡單分類及描述 (GO 2006)。MIPS 分類系統的功能分類目錄 (MIPS_FunCat; http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html) 由 22 個主要功能種類所組成，可用來對不同生物之基因組進行註解之分類，是研究者對基因及其產物進行功能分類時常參考的資料庫 (Andreas *et al.* 2004; Mewes *et al.* 2006)。因此，本研究以 Chiu *et al.* (2007) 所建立之 EST 功能分析流程為基礎，將受稻熱病菌誘導之水稻 EST 單一序列的各基因庫 FASTA 格式檔案，先去比對 TGI 中 Rice (*O. sative*) 之 TC 資料庫（搜尋比對之 E 值內設為 10），由比對結果找出具最低 E 值的 TC 以進行功能註解，再根據 GO 之三個層次分類及 MIPS_FunCat 之 22 個主要功能種類目錄，將比對到的結果，進一步進行基因各類功能表現量的統計分析。由於這部份的 EST 資料量非常龐大（共 84,705 筆），為減少 EST 功能註解所需的人力及時間，本研究同時利用 Perl 語言撰寫程式，將整個流程建立了自動化分析系統 (Lu *et al.* 2006)，以快速準確地完成 EST 全程的功能分析工作。

利用多變數統計技術進行基因庫與功能間關係之探討

由於受稻熱病菌誘導之水稻 EST 資料涉及到多個 cDNA 基因庫（內含不同品種、不同植株部位、不同發育時期之水稻 EST 資料），為探討各功能類別與基因庫間之關係，故在同時考慮多個 EST 功能類別下將所有 cDNA 基因庫依其相似或相異程度，首先利用集群分析的全連法 (complete

linkage) 進行分群，以得到 cDNA 基因庫的樹狀圖 (dendrogram)。集群分析是一種一般邏輯程序，能根據相似性與相異性，客觀地將相似者歸在同一群內，其一般原則是使同一集群內的個體差異性最小，而不同集群間的個體則具有最大差異性；而集群分析中可選擇多種演算法，其中全連法是以最遠的點之間的距離做爲集群間的距離，又稱爲遠鄰法 (farthest neighbor)，以最遠的個體來判斷相似性，最不容易造成連鎖，故形成的樹最長（故又稱長臂法），可使個體之間形成最緊湊的群，在生物學上最好解釋 (Lepš & Šmilauer 1999)。

接著本研究也進行對應分析，以得到 cDNA 基因庫與功能類別在二維空間的圖示關係。對應分析爲 Benzécri 於 1973 年所提出，又稱爲相互平均法 (reciprocal averaging; Hill 1973)，用於分析簡單二維及多維表格的行與列之間的對應關係，是一種廣泛運用到生態學（尤其是植物生態學）的多變數技術。該法現已大量應用到其他各方面研究領域 (Beh 2004)，包括基因組分析上之各種應用 (Gupta & Ghosh 2001; Tekaia *et al*. 2002; Tan *et al*. 2004)。對應分析對於數據的要求比較簡單，不需要有嚴格的線性關係，也無須限定所處理的資料是連續或離散變數，只需要是一個列聯表的資料形式，即可將多維之變數或樣本於一個低維空間上以一個序列分佈圖 (ordination diagram) 呈現，以研究出其變數間或樣本間之關係，也可將變數和樣本放在同一張圖（稱爲雙標圖，biplot）上用來同時表達出變數與樣本二者間相互對應的關係 (Lepš & Šmilauer 1999; Oksanen 2004)。本研究藉由對應分析所得之 cDNA 基因庫的序列分佈圖，利用各基因庫點落在圖上之距離遠近，來輔助上述集群分析之樹狀圖的分群結果判斷，倘發現點間有群團現象表示可能是同一群；同時進而繪製 cDNA 基因庫與功能類別在同一張圖上的雙標圖，以辨識出 cDNA 基因庫分群結果與功能類別兩者之間的相互關係，倘某功能類別與該基因庫群的關係密切但與其他群關係較遠，表示其爲該基因庫群之所以異於其他群的主要功能類別。

本研究的集群分析和對應分析都是使用 STATISTICA 統計軟體 (Statsoft Inc. 2002)，在 Window 作業系統個人電腦上執行。

結　　果

EST 的聚集與接合

擷取自 NCBI 之 dbEST 資料庫中受稻熱病菌誘導的水稻 EST 序列共 84,705 條，分屬於 14 個 cDNA 基因庫，分別利用 CAP3 序列接合程式進行聚集及接合後，各基因庫分別獲得 14-14,281 條單一序列（表 2）。當基因庫內 EST 序列條數較多時，序列之間的覆蓋率相對較高，經 CAP3 序列接合程式處理後所減少之序列多餘性的量亦相對較多，如 CBir36 基因庫內含 18,241 條 EST 序列，所減少的多餘性可達 61%（即所產生的單一序列所佔比例爲 39%），而 CBbare 基因庫的 EST 資料量近 5 萬筆，其減少之多餘性更高達 71%（單一序列所佔比例爲 29%）。

EST 單一序列之功能的註解、分類及表現量統計

將受稻熱病菌誘導之水稻 EST 經聚集及接合後所產生的單一序列，藉由比對 TC 所搜尋之結果進行功能註解，再連結對應到 GO 功能分類系統，並計算 GO 分類系統之功能類別基因表現的個數及百分比，結果如表 3。結果顯示來自不同品種、不同植株部位及不同發育時期受稻熱病菌誘導之水稻 EST，其所屬的功能分類在 GO 粗分類層次上之表現差異不大，整體來說皆以生物程序 (biological process) 功能爲主 (34.2-43.1%) ，其次是細胞組成 (cellular component) 功能 (29.3-36.8%)，而分子功能 (molecular function) 相關基因則最少 (25.0-32.2%)。

進而利用 GO 分類代碼與 MIPS 分類目錄代碼間的對應關係，得到在 MIPS 功能分類系統下各 cDNA 基因庫之更細分的功能類別所佔 EST 個數及其比例，示如表 4。根據這些 cDNA 基因庫的來源品種（表 1），再區分秈稻 (indica rice)、稉稻 (japonica rice) 及野生稻 (wild rice) 來比較其間差異（圖 1），發現各品種受稻熱病菌誘導之水稻 EST，都具有代謝 (metabolism)、能量 (energy)、細胞週期及 DNA 修飾 (cell cycle and DNA processing)、蛋白質循環轉變（即蛋白質的折疊、修飾和傳送終點之生命週期，protein fate / folding, modification, destination）、細胞生長和形態發生 (cell growth / morphogenesis)、次細胞定位 (subcellular localization)、蛋白質結合 (protein binding)、傳輸促進作用 (transport facilitation) 和無法功能歸類之蛋白質 (unclassified proteins) 等功能。除無法功能歸類之蛋白質外，各水稻品種均以次細胞定位之功能的基因表現量最高，但以野生稻所佔比例 (27.5%) 高於秈稻 (21.8%) 和稉稻 (18.9%)。除此，野生稻的代謝 (7.3%)、細胞生長和形態發生 (2.5%) 及傳輸促進作用 (10.0%) 之功能的基因量，也高於秈稻（各 5.9、0.1、5.7%）和稉稻（各 6.1、0.2、3.6%）。然而，野生稻的能量 (3.0%)、蛋白質循環轉變 (0.5%) 及蛋白質結合 (1.5%) 之功能的基因表現量，則低於秈稻（各 7.0、7.2、5.7%）和稉稻（各 4.1、7.1、3.6%），尤其是蛋白質循環轉變功能之基因的表現差異最爲明顯。另外，秈稻的能量功能之基因表現量略高於稉稻，而稉稻的蛋白質合成 (protein synthesis) 功能之基因表現量 (4.1%) 略高於秈稻 (1.1%)。各品種無法功能歸類之蛋白質所佔比例高達 36.7-45.5%，表示仍存在有未知功能之基因，故值得未來再進一步探討這些無法歸類蛋白質之功能爲何。至於圖 1 中的未知水稻品種 EST，因序列提供者並未說明品種爲何，但從本研究中並未發現它和其他已知品種之功能基因表現有特別明顯相似或相異，故難以將它與已知品種來相互作比較，不擬作特別探討。

表 2. 受稻熱病菌誘導之水稻 EST 序列經 CAP3 聚集及接合的結果

Table 2. Clustering and assembly results with CAP3 software in rice ESTs induced by *Magnaporthe grisea*

cDNA library	EST no.	EST length (bp)	Contig no.	Contig length (bp)	Singleton no.	Singleton (%)	Singleton length (bp)	Unique[z] sequence no.	Unique[z] sequence %
BF-1	14	173-577	0	0	14	100	173-577	14	100
AF	46	60-600	2	253-337	40	87	60-600	42	91
CD	109	62-815	13	248-570	69	63	104-815	82	75
BF-2	111	115-798	1	671	109	98	115-798	110	99
BI-2	250	152-1175	38	285-1052	166	66	152-1175	204	82
BU	434	48-820	32	176-827	333	77	48-794	365	84
BM-2	1088	60-1086	122	234-1083	707	65	60-821	829	76
BQ	3360	58-958	457	25-1088	1707	51	73-958	2164	64
BM-1	3784	132-1070	530	316-1023	1798	48	144-1070	2328	62
BI-1	6437	146-860	994	241-1085	2642	41	146-860	3636	56
CBir36	18241	159-979	2873	208-4479	4257	23	166-952	7130	39
CBbare	49403	152-973	6987	167-4379	7294	15	152-952	14281	29
DN	287	143-1733	9	297-1411	180	63	143-1733	189	66
CX	1141	152-686	148	242-925	643	56	152-686	791	69
Total	84705		12206		19959			32165	

[z] Unique sequences = contigs and singletons.

表 3. 在 GO 功能分類系統下受稻熱病菌誘導之水稻 EST 的功能類別統計

Table 3. Statistics of functional classification for rice ESTs induced by *Magnaporthe grisea*, based on GO functional category

	GO functional category					
	Molecular function		Biological process		Cellular component	
cDNA library	EST no.	%	EST no.	%	EST no.	%
BF-1	11	28.9	13	34.2	14	36.8
AF	17	31.5	19	35.2	18	33.3
BF-2	77	27.1	108	38.0	99	34.9
BI-1	1884	30.5	2386	38.6	1904	30.8
BI-2	174	30.9	213	37.8	177	31.4
BM-1	1345	29.8	1754	38.8	1420	31.4
BM-2	492	28.5	671	38.8	566	32.7
BQ	1168	30.0	1484	38.1	1246	32.0
BU	128	27.6	185	39.9	151	32.5
CBbare	9021	32.2	10681	38.1	8334	29.7
CBir36	4761	31.9	5801	38.8	4372	29.3
CD	29	27.9	38	36.5	37	35.6
CX	554	27.4	744	36.8	722	35.7
DN	40	25.0	69	43.1	51	31.9

將受稻熱病菌誘導之水稻 EST，再根據各 cDNA 基因庫的來源組織和感染時期（表 1），區分爲幼苗期葉片（AF 基因庫）、分蘗期葉片（如 BF-1、BI-2、CBir36、CBbare、CD 及 CX 基因庫，含發芽後 16 天、3 週及營養生長期的葉片）、抽穗成熟期葉片（如 BI-1、BM-1、BM-2、BQ 及 BU 基因庫）以及不同部位組織（如 BF-2 及 DN 基因庫，其發育時期未知），以檢視其間的功能基因表現差異，結果如圖 2 所示。結果顯示，隨著植株成長，水稻葉片愈近生長後期，受稻熱病菌侵染後，代謝和能量之相關功能的基因表現量愈高，但次細胞定位功能之基因的表現量似乎有減少現象；幼苗期的葉片甚至完全沒有表現出能量功能之基因量，但次細胞定位功能之基因表現量卻高於生長後期的葉片，而且蛋白質循環轉變功能之基因表現量居次，也明顯高於生長後期葉片之表現。相對於固定葉片組織，混合了不同組織的水稻 EST 似乎表現出較低的代謝功能 (3.4%) 與較高的能量功能 (10.7%)，而其他功能之基因表現量則相異不大。

利用多變數統計技術進行基因庫與功能間關係之探討

進而針對 MIPS 功能分類系統之分析結果，分別以集群分析和對應分析對 14 個 cDNA 基因庫結果進行相異性分群。根據所得的樹狀圖（圖 3-A）以歐氏距離 (Euclidean distances) 約 22.4 之距離位點劃分和序列分布圖（圖 3-B）之綜合結果來看，大致可將 14 個 cDNA 基因庫依其相異性分成三群（Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ）；然而，發現第Ⅰ群 cDNA 基因庫之分布過於緊密，難以看出此群 cDNA 基因庫間之差異性，於是重新檢視 EST 資料，發現可能是由於 AF 與 BF-1 基因庫之單一序列條數過少，各 42 及 14 條（表 2），恐怕會影響了整體分析之準確度，故本研究進而再將 AF 與 BF-1 這二個基因庫移除後，重新分析。

表 4. 在 MIPS 功能分類系統下受稻熱病菌誘導之水稻 EST 的功能類別統計

Table 4. Statistics of functional classification for rice ESTs induced by *Magnaporthe grisea*, based on MIPS functional category

	MIPS functional category[z]																	
cDNA library	1	2	3	4	5	6	8	10	11	13	14	25	30	40	63	65	67	99
— EST no. —																		
AF	3	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	9	2	0	3	10
BF-1	0	0	0	0	1	2	0	3	1	1	0	1	0	6	2	0	0	4
BF-2	6	17	5	0	7	37	7	4	16	0	0	1	9	91	30	0	7	46
BI-1	253	210	60	19	106	269	97	67	77	14	36	16	79	805	269	0	156	903
BI-2	39	34	19	1	8	12	5	16	7	1	9	3	6	106	32	0	13	101
BM-1	204	168	58	20	67	179	63	43	51	13	18	13	61	610	185	0	126	686
BM-2	88	82	18	2	29	73	29	16	24	5	11	7	29	241	82	0	47	226
BQ	161	138	50	12	87	184	74	53	58	12	22	8	60	635	190	0	105	553
BU	34	27	17	1	13	26	16	3	17	0	12	3	1	93	29	0	7	74
CBbare	1221	780	567	135	400	1447	678	393	306	144	139	65	565	4267	1688	11	822	5623
CBir36	705	445	345	63	222	902	356	235	187	61	81	30	282	2272	1058	3	474	2622
CD	6	2	4	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	20	2	0	3	22
CX	74	109	20	8	56	95	49	24	24	2	4	3	48	416	83	0	47	269
DN	1	5	1	0	1	3	2	0	1	0	0	0	1	13	5	0	5	19
— % —																		
AF	5.4	0.0	5.0	0.0	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	26.1	5.0	0.0	6.1	37.5
BF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	4.8	0.0	7.1	2.4	2.4	0.0	7.1	0.0	23.8	9.5	0.0	0.0	35.7
BF-2	4.5	9.4	2.9	0.0	1.3	9.2	1.8	0.2	1.2	0.0	0.0	0.8	2.6	21.9	3.7	0.0	4.7	35.7
BI-1	9.0	5.9	0.9	0.8	2.0	8.4	1.6	1.2	1.1	0.2	0.3	0.7	1.5	17.1	6.5	0.0	5.4	37.4
BI-2	11.2	6.7	1.8	0.2	2.5	3.5	1.5	3.3	2.9	1.0	0.2	0.2	0.2	17.5	5.8	0.0	4.4	37.2
BM-1	10.2	5.9	1.1	0.9	1.6	7.5	2.0	1.1	0.9	0.5	0.2	0.5	1.7	17.6	5.7	0.0	6.3	36.2
BM-2	11.6	8.7	1.3	0.2	2.1	7.4	2.7	1.0	1.5	0.5	0.3	0.5	2.3	18.4	6.7	0.0	4.8	30.0
BQ	9.3	5.7	1.0	0.7	2.4	6.7	2.3	1.4	1.0	0.4	0.2	0.4	1.8	19.6	5.4	0.0	5.7	36.0
BU	14.3	12.7	0.5	0.1	1.2	7.6	0.3	1.3	1.5	0.0	0.4	0.2	0.2	16.4	4.5	0.0	1.5	37.2
CBbare	8.4	3.8	1.2	0.7	1.8	7.6	1.5	1.3	0.8	0.3	0.3	0.4	1.5	15.1	7.0	0.1	5.3	42.9
CBir36	9.1	3.7	1.5	0.6	2.1	9.6	1.6	1.2	0.9	0.3	0.3	0.4	1.6	15.2	8.4	0.0	5.7	37.8
CD	7.3	3.0	2.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	27.5	1.5	0.0	10.0	45.5
CX	7.0	9.1	1.1	0.9	5.5	6.5	2.1	0.7	0.9	0.1	0.1	0.3	2.1	21.6	4.9	0.0	3.5	33.3
DN	2.4	11.9	2.4	0.0	0.5	3.4	3.2	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.6	21.9	8.1	0.0	7.6	36.4

[z] Functional category：1- metabolism, 2- energy, 3- cell cycle and DNA processing, 4- transcription, 5- protein synthesis, 6- protein fate (folding, modification, destination), 8- cellular transport and transport mechanisms, 10- cellular communication / signal transduction mechanism, 11- cell rescue, defense and virulence, 13- ionic homeostasis, 14- cell growth / morphogenesis, 25- development (systemic), 30- control of cellular organization, 40- subcellular localization, 63- protein binding, 65- storage protein, 67- transport facilitation, 99- unclassified proteins.

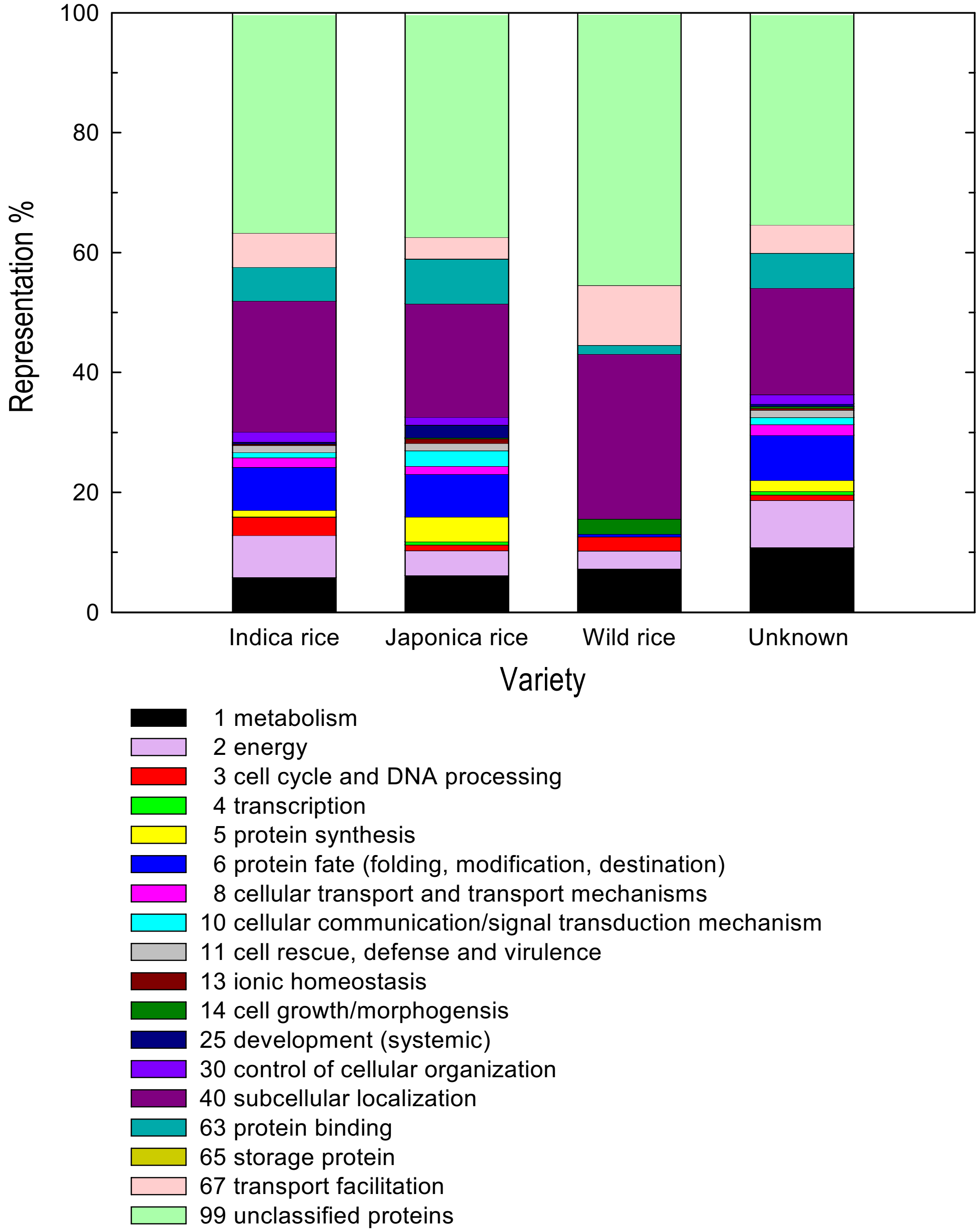


圖 1. 在 MIPS 功能分類系統下受稻熱病菌誘導之不同水稻品種之 EST 的比較。

Fig. 1. Comparison of rice EST induced by *Magnaporthe grisea* among different rice varieties, based on MIPS functional category system.

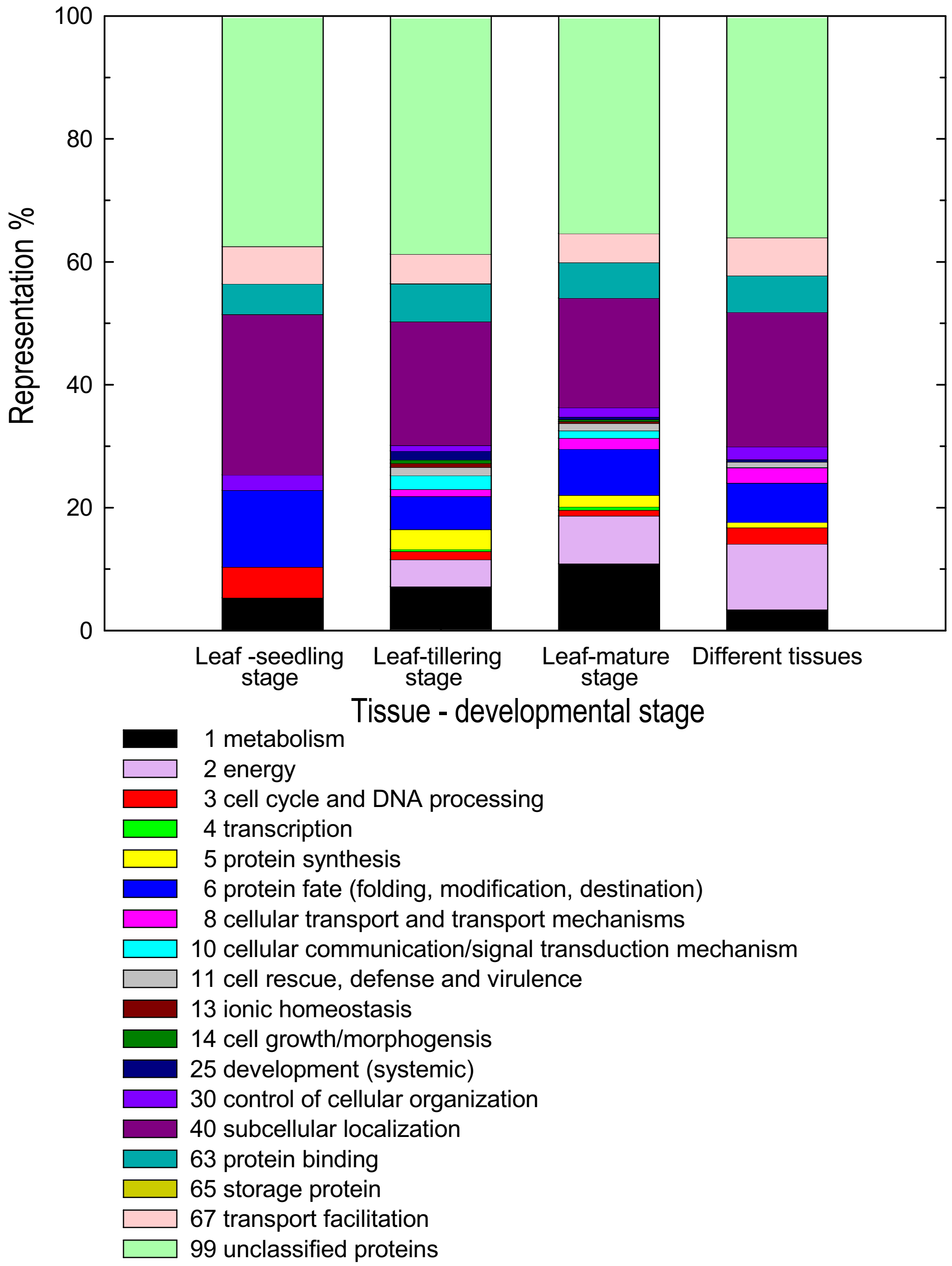
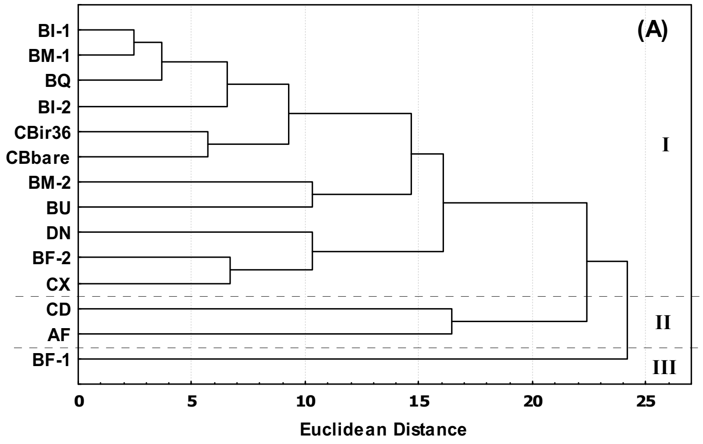


圖 2. 在 MIPS 功能分類系統下受稻熱病菌誘導之不同水稻植株部位與不同發育時期之 EST 的比較。

Fig. 2. Comparison of rice EST induced by *Magnaporthe grisea* among different rice tissues and developmental stages, based on MIPS functional category system.



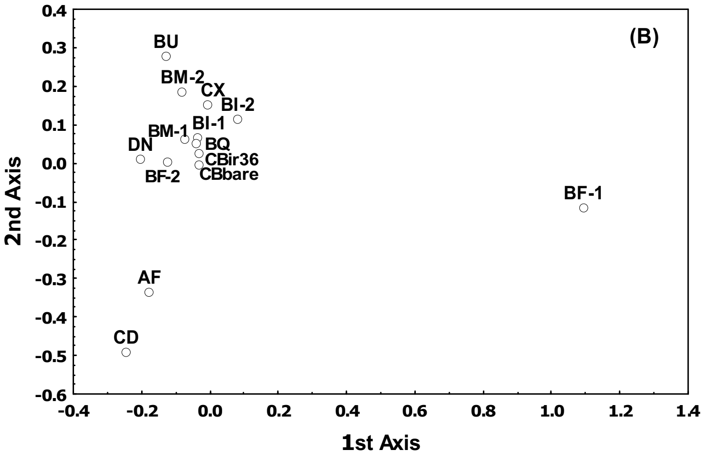


圖 3. 受稻熱病菌誘導之 14 個水稻 cDNA 基因庫的基因表現之分群結果。(A) 集群分析採全連法之樹狀圖，(B) 對應分析之序列分布圖。

Fig. 3. Grouping results of gene expression of 14 rice cDNA libraries induced by *Magnaporthe grisea.* (A) Dendrogram of clustering analysis using complete linkage, (B) Ordination diagram of correspondence analysis.

移除 AF 與 BF-1 基因庫後，在同時考慮多個 EST 功能類別下，12 個 cDNA 基因庫所得的樹狀圖（圖 4-A）以歐氏距離約 16.1 之距離位點劃分和序列分布圖（圖 4-B）之綜合結果來看，大致可將 12 個 cDNA 基因庫依其相異性分成 3 群（以 I 、II 和 III 表示）：第 I 群包含 BI-1, BM-1, BQ, BI-2, CBir36, CBbare, BM-2, BU 此八個 cDNA 基因庫，除了 BI-1, BM-1, BM-2, BQ 及 BU 爲未知品種外，其他序列來源均屬於單一品種、單一感染部位; 第 II 群包含 DN, BF-2, CX 此三個 cDNA 基因庫，序列來源分別混合不同品種之不同組織、混合不同品種之葉片組織；第 III 群則僅有 CD 一個 cDNA 基因庫，屬於野生稻之葉片組織。

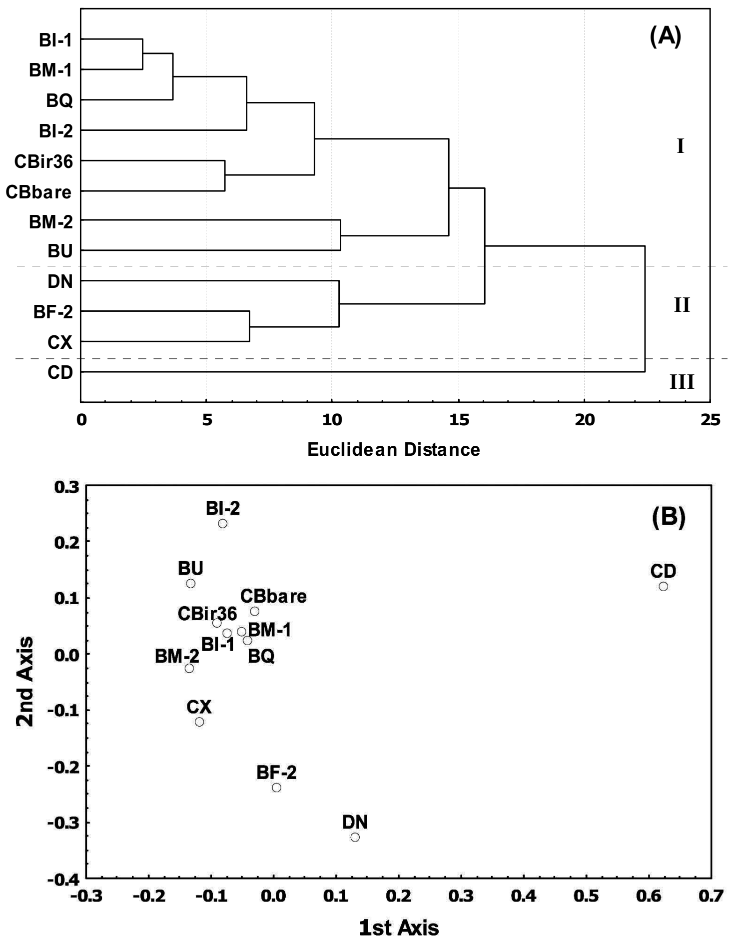


圖 4. 受稻熱病菌誘導之 12 個水稻 cDNA 基因庫的基因表現之分群結果。(A) 集群分析採全連法之樹狀圖，(B) 對應分析之序列分布圖。

Fig. 4. Grouping results of gene expression of 12 rice cDNA libraries induced by *Magnaporthe grisea*. (A) Dendrogram of clustering analysis using complete linkage, (B) Ordination diagram of correspondence analysis.

利用對應分析再將 12 個 cDNA 基因庫與 EST 功能類別放在同一張圖上所得之雙標圖如圖 5 所示，可看出基因庫分群結果與其功能類別間之相互關係：由於細胞間聯絡及訊息傳導之機制 (cellular communication / signal transduction mechanism)、離子恆定性 (ionic homeostasis) 與貯藏性蛋白 (storage protein) 之功能與第 I 群 cDNA 基因庫之關係較近，但與其他兩群之 cDNA 基因庫關係較遠，因此推估第 I 群 cDNA 基因庫之 EST 可能主要是受到大量表現出這 3 種蛋白質功能，而導致與其他兩群的 cDNA 基因庫有明顯差異；而第Ⅱ群 cDNA 基因庫之 EST 可能主要是受到大量表現出能量、細胞間聯絡及訊息傳導之機制與細胞組織之控制 (control of cellular organization) 之功能，而異於其他兩群；至於第Ⅲ群 cDNA 基因庫之 EST 則可能主要是受到表現出大量的細胞生長／形態發生和傳輸促進功能，而異於其他兩群，尤其以細胞生長和形態發生之功能的影響最大。若檢視各群之 EST 以 MIPS 功能分類系統下各功能類別所佔比例之平均值（表 5），可看出第 I 群之

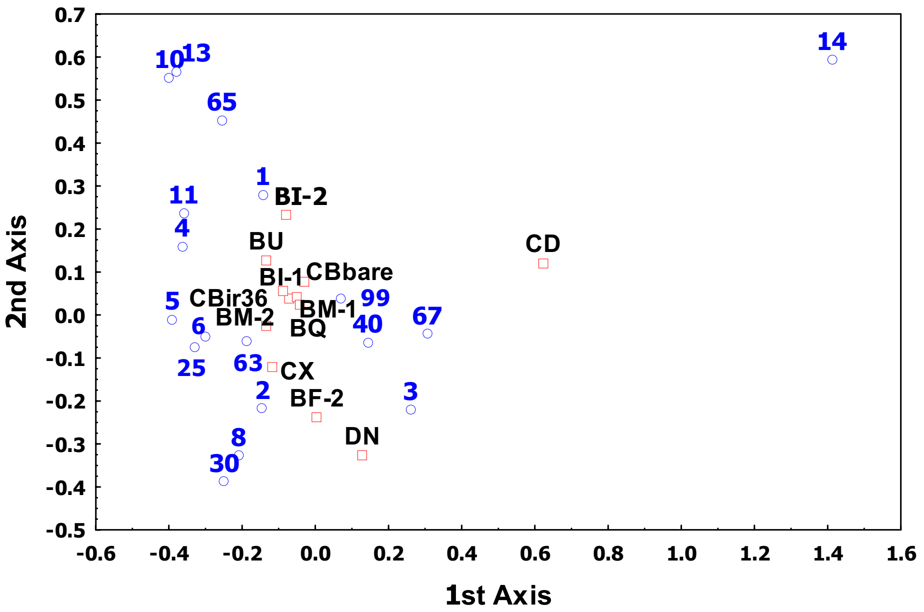


圖 5. 利用對應分析顯示 12 個水稻 cDNA 基因庫與其 MIPS 分類系統所得之功能類別之關係的雙標圖。(cDNA 基因庫：BI-1, BM-1, BQ, BI-2, CBir36, CBbare, BM-2, BU, DN, BF-2, CX, CD；功能類別：1-代謝, 2-能量, 3-細胞週期及 DNA 修飾, 4-轉錄, 5-蛋白質合成, 6-蛋白質命運/折疊,修飾,傳送終點, 8-細胞傳輸及其機制, 10-細胞間聯絡及訊息傳導之機制, 11-細胞援救、防禦和毒性, 13-離子恆定性, 14-細胞生長/形態發生, 25-發育（系統性的）, 30-細胞組織之控制, 40-次細胞定位, 63-蛋白質結合, 65-貯藏性蛋白, 67-傳輸促進作用, 99-功能未歸類之蛋白質）

Fig. 5. A biplot showing the interrelationships between 12 rice cDNA libraries and their functional classifications using correspondence analysis based on MIPS functional category system. (cDNA library:BI-1, BM-1, BQ, BI-2, CBir36, CBbare, BM-2, BU, DN, BF-2, CX, CD; Functional category:1- metabolism, 2- energy, 3- cell cycle and DNA processing, 4- transcription, 5- protein synthesis, 6- protein fate / folding, modification, destination, 8- cellular transport and transport mechanisms, 10- cellular communication / signal transduction mechanism, 11- cell rescue, defense and virulence, 13- ionic homeostasis, 14- cell growth / morphogenesis, 25- development (systemic), 30- control of cellular organization, 40- subcellular localization, 63- protein binding, 65- storage protein, 67- transport facilitation, 99- unclassified proteins)

EST 的貯藏性蛋白功能之相關基因雖然表現量不高（僅 0.02%），但於其他兩群之表現量均爲 0%；而細胞間聯絡及訊息傳導之機制功能之相關基因表現量 (1.48%) 高於其他兩群 (0-0.30%)，以及離子恆定性功能 (0.40%) 高於其他兩群 (0-0.03%)；第Ⅱ群之 EST 之能量功能 (10.14%) 高於其他兩群 (2.95-6.63%)，而細胞間聯絡及訊息傳導之機制功能 (2.38%) 亦高於其他兩群 (0-1.68%)，以及細胞組織之控制 (2.11%) 也是高於其他兩群 (0-1.36%)；最後第Ⅲ群之野生稻 (CD) 之細胞生長和形態發生功能 (2.50%) 高於其他兩群 (0.05-0.27%)，以及傳輸促進作用功能 (10.00%) 高於其他兩群 (4.89-5.29%)。由此也佐證了從對應分析雙標圖中所獲之結果。

表 5. 受稻熱病菌誘導之水稻 EST 各群在 MIPS 功能分類系統所得的功能類別統計

Table 5. Statistics of functional classification for rice EST induced by *Magnaporthe grisea* under each individual group, based on MIPS functional category system

Functional category		Representation (%)		
		Group Ⅰ	Group Ⅱ	Group Ⅲ
MIPS_ funcat ID.	Definition	(BI-1, BM-1, BQ, BI-2, CBir36, CBbare, BM-2, BU)	(DN, BF-2, CX)	(CD)
1	Metabolism	10.4	7.29	7.29
2	Energy	6.63	10.14	2.95
3	Cell cycle and DNA processing	1.16	2.14	2.36
4	Transcription	0.54	0.00	0.00
5	Protein synthesis	1.96	2.45	0.00
6	Protein fate / folding, modification, destination	6.41	6.41	0.45
8	Cellular transport and transport mechanisms	1.68	2.38	0.00
10	Cellular communication / signal transduction mechanism	1.48	0.30	0.00
11	Cell rescue, defense and virulence	1.33	0.88	0.00
13	Ionic homeostasis	0.40	0.03	0.00
14	Cell growth / morphogenesis	0.27	0.05	2.50
25	Development (Systemic)	0.42	0.37	0.00
30	Control of cellular organization	1.36	2.11	0.00
40	Subcellular localization	17.11	21.81	27.53
63	Protein binding	6.25	5.58	1.45
65	Storage protein	0.02	0.00	0.00
67	Transport facilitation	4.89	5.29	10.00
99	Unclassified proteins	36.83	35.15	45.45

討　　論

抗病植物遭受病原菌侵染後之所以產生抗性，是由於活化了植物體內的抗病基因，進而透過訊號傳導鏈啓動了植物體內的防禦體制。由上述結果證實，水稻受稻熱病菌侵染後的防禦反應之過程是涉及眾多基因共同表現的一個複雜的網絡體系。但是受稻熱病菌誘導的水稻 EST 序列若是取自於混合了不同品種及不同植株部位之組織，與使用單一品種及固定植株部位組織所得的 EST 序列在基因表現上存在有明顯差異（圖 4-A, B、圖 5 及表 5），這是因爲基本上不同部位組織或不同品種個體，它們的基因表現本身就是有差異的。因此，建議未來各研究單位在以 EST 爲分析材料進行功能基因表現之研究時，應盡量分開品種和植株部位。

本研究結果發現，各水稻品種受稻熱病菌侵染後的次細胞定位功能之基因表現量皆會增加（表 4、圖 1），這是因爲細胞中蛋白質合成後被轉運到特定的胞器中，只有轉運到正確的部位才能參與細胞的各種生命活動（如細胞週期的調控過程、細胞的訊號傳導和轉錄調控等），若細胞內的定位發生偏差，將會對細胞功能甚至生命產生重大影響 (Dönnes & Höglund 2004; Zhang *et al.* 2007)。本研究進而發現受稻熱病菌誘導之野生稻 EST，以表現次細胞定位和代謝功能之基因量明

顯高於粳稻及秈稻（圖 1），此驗證了 Cho *et al.* (2004) 之結果，他指出相較於栽培稻，野生稻於營養生長期之葉片組織具有更活躍的新陳代謝能力，其表現以次細胞定位與代謝功能之基因為主。另外，Shim *et al.* (2004) 也發現在感染稻熱病之情況下野生稻的代謝功能之基因表現量超過栽培種，且指出新陳代謝變化量對於抵抗病原菌侵害扮演了不可或缺之角色。這是因為水稻在逆境狀態下為了維持細胞的動態平衡，有一些參與 ATP 合成途徑之關鍵基因會同時被誘導表現出來而活化了能量的合成代謝 (Umeda *et al.* 1994)。Song & Shi (2006) 之研究結果指出，過氧化物酶 (peroxidase, POD) 是細胞內重要的內源性活性氧清除劑，當植物受稻熱病菌入侵後，會誘發啓動某些基因的表達，合成 POD 而啓動多種代謝途徑；在植物品種與病原物互作產生親和性和非親和性反應並引發多種生理生化反應中，抗病品種的 POD 活性較感病品種上升速度快，故抗病品種啓動代謝途徑的能力相對地也較感病品種為強。而由本研究結果發現受稻熱病菌侵染後，野生稻的代謝功能之基因表現量較高於粳稻及秈稻，藉此可推測野生稻啓動代謝途徑的能力較栽培稻為強，而使野生稻抵抗稻熱病菌的能力可能較高於栽培稻。野生稻受稻熱病菌侵染後表現出的傳輸促進作用之基因量也較高（圖 1），按可能是因為在植物抗病反應過程中，抗病訊號必須由內源訊號分子從受病菌侵入部位傳輸到整株植物，以引起相應的系統性抗性，因而較具抗性之品種傳輸內源訊號分子的速度通常也較快 (Halterman & Martin 1997)。而與細胞生長和形態發生相關的基因在野生稻表現含量也較高（圖 1），表示野生稻在對抗稻熱病菌的防禦反應過程中，細胞生長、發育過程受到較大的刺激活化，此將促使有機體能更強壯以增加防禦的能力。Cho *et al.* (2004) 指出野生稻和感染稻熱病之栽培稻所表現出的能量功能之基因量，皆較高於正常未染病的栽培稻，而由本研究結果進而發現（圖 1），水稻受稻熱病菌侵染後，與能量相關的基因表現量以秈稻最高，粳稻其次，而野生稻較低。另外，野生稻受稻熱病菌侵染後的蛋白質循環轉變功能之基因表現量，也明顯低於栽培種（圖 1）。由此看來，未來值得針對野生稻的防禦體系做更深入探討，當有助於水稻對稻熱病抗性的分子機制研究。

受稻熱病菌誘導之水稻 EST 在不同植株部位及不同葉齡的基因表現差異，主要反映在能量和代謝功能（圖 2）：在不同生長階段中，水稻葉片於成熟期受稻熱病菌侵染後的能量和代謝之功能的基因表現量最高，然後是分蘗期，幼苗期則最低甚至完全沒有表現出能量功能之基因量，按此推測水稻葉片隨著植株成長，愈到後期，其啓動代謝途徑的能力愈強，表示其對稻熱病愈具抗性。另外，本研究也發現幼苗葉片受稻熱病菌侵染後的蛋白質循環轉變和次細胞定位之相關功能的基因表現量較生長後期的葉片為高，但由於幼苗期葉片的 EST 資料僅來自於 AF 基因庫，該基因庫僅有 46 條 EST 序列（表 1），此分析結果之可信度，仍待未來有更多 EST 資料加入後始能確認。目前已登錄在 dbEST 內受稻熱病菌誘導之水稻 EST，絕大多數取自葉片組織，而源自於其他不同組織者只有 BF-2 和 DN 兩個 cDNA 基因庫，但該兩者都是將不同組織混合一起（表 1），因此從現有 EST 資料的分析結果來看，最多只能確認混合組織和固定組織（葉片）間有明顯不同，尚難以真正區分出水稻在不同感染植株部位間之基因表現型式的差異性。

誌　謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會補助經費 (NSC92-2313-B-055-006, NSC93-2313-B-055-002)，特此誌謝。

引用文獻 (Literature cited)

Adams, M. D., M. Dubnick, A. R. Kerlavage, R. Moreno, J. M. Kelley, T. R. Utterback, J. W. Nagle, C. Fields, and J. C. Venter. 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. Nature 355:632-634.

Adams, M. D., J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C. R. Merril, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno, A. R. Kerlavage, W. R. McCombie, and J. C. Venter. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science 252:1651-1656.

Adams, M. D., A. R. Kerlavage, R. D. Fleischmann, R. A. Fuldner, C. J. Bult, N. H. Lee, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. D. Gocayne, O. White, G. Sutton, J. A. Blake, R. C. Brandon, M. W. Chiu, R. A. Clayton, R. T. Cline, M. D. Cotton, J. Earle-Hughes, L. D. Fine, L. M. FitzGerald, W. M. FitzHungh, J. L. Fritchman, N. S. M. Geoghagen, A. Glodek, C. L. Gnehm, M. C. Hanna, E. Hedblom, P. S. Hinkle Jr., J. M. Jelley, K. M. Klimek, J. C. Kelley, L. I. Liu, S. M. Marmaros, J. M. Merrick, R. F. Moreno-Palanques, L. A. McDonald, D. T. Nguyen, S. M. Pellegrino, C. A. Phillips, S. E. Ryder, J. L. Scott, D. M. Saudek, R. Shirley, K. V. Small, T. A. Spriggs, T. R. Utterback, J. F. Weidman, Y. Li, R. Barthlow, D. P. Bednarik, L. Cao, M. A. Cepeda, T. A. Coleman, E. J. Collins, D. Dimke, P. Feng, A. Ferrie, C. Fischer, G. A. Hastings, W. W. He, J. S. Hu, K. A. Huddleston, J. M. Greene, J. Gruber, P. Hudson, A. Kim, D. L. Kozak, C. Kunsch, H. Ji, P. S. Meissner, H. Olsen, L. Raymond, Y. F. Wei, J. Wing, C. Xu, G. L. Yu, S. M. Ruben, P. J. Dillon, M. R. Fannon, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, C. Fields, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. Nature 377(6457 Suppl.):3-174.

Andreas. R., A. Zollner, D. Maier, K. Albermann, J. Hani, M. Mokrejs, I. Tetko, U. Güldener, G. Mannhaupt, M. Münsterkötter, and H. W. Mewes. 2004. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. Nucleic Acids Res. 32:5539-5545.

Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science 276:726-733.

Beh. E. J. 2004. A Bibliography of the Theory and Application of Correspondence Analysis. Vol. II-By Publication. School of Quantitative Methods and Mathematical Sciences, Univ. Western Sydney, Australia. 101 pp.

Boguski, M. S., T. M. Lowe, and C. M. Tolstoshev. 1993. dbEST--database for “expressed sequence tags”. Nat. Genet. 4:332-333.

Bonaldo, M. F., G. Lennon, and M. B. Soares. 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. Genome Res. 6:791-806.

Chiu, Y. C., M. L. Wei, C. T. Lu, and H. Y. Lu. 2007. A new procedure of functional annotation and analysis in expressed sequence tag (EST). Crop, Enviro. Bioinfor. 4:49-64. (in Chinese with English abstract)

Cho, S. K., S. H. Ok, J. U. Jeung, K. S. Shim, K.W. Jung, M. K. You, K. H. Kang, Y. S. Chung, H. C. Choi, H. P. Moon, and J. S. Shin. 2004. Comparative analysis of 5211 leaf ESTs of wild rice (*Oryza minuta*). Plant Cell Rep. 22:839-847.

Dönnes P., and A. Höglund. 2004. Predicting protein subcellular localization: Past, present, and future. Genom. Proteom. Bioinform. 2:209-215.

Ewing, R. M., A. B. Kahla, O. Poirot, F. Lopez, and S. Audic, and J. M. Claverie. 1999. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. Genome Res. 9:950-959.

Feng, Q., Y. Zhang, P. Hao, S. Wang, G. Fu, Y. Huang, Y. Li, J. Zhu, Y. Liu, X. Hu, P. Jia, Y. Zhang, Q. Zhao, K. Ying, S. Yu, Y. Tang, Q. Weng, L. Zhang, Y. Lu, J. Mu, Y. Lu, L. S. Zhang, Z. Yu, D. Fan, X. Liu, T. Lu, C. Li, Y. Wu, T. Sun, H. Lei, T. Li, H. Hu, J. Guan, M. Wu, R. Zhang, B. Zhou, Z. Chen, L. Chen, Z. Jin, R. Wang, H. Yin, Z. Cai, S. Ren, G. Lv, W. Gu, G. Zhu, Y. Tu, J. Jia, Y. Zhang, J. Chen, H. Kang, X. Chen, C. Shao, Y. Sun, Q. Hu, X. Zhang, W. Zhang, L. Wang, C. Ding, H. Sheng, J. Gu, S. Chen, L. Ni, F. Zhu, W. Chen, L. Lan, Y. Lai, Z. Cheng, M. Gu, J. Jiang, J. Li, G. Hong, Y. Xue, and B. Hanand. 2002. Sequence and analysis of rice chromosome 4. Nature 420:316-320.

Gene Ontology Consortium. 2006. The Gene Ontology (GO) project in 2006. Nucleic Acids Res. 34:D322-D326.

Gupta, S. K., and T. C. Ghosh. 2001. Gene expressivity is the main factor in dictating the codon usage variation among the genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 273:63-70.

Halterman, D. A., and G. B. Martin. 1997. Signal recognition and transduction involved in plant disease resistance. Essays Biochem. 32:87-99.

Hill, M. O. 1973. Reciprocal averaging: an eigenvector method of ordination. J. Ecol. 61:237-249.

Huang, X., and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. 9:868-877.

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice. Nature 436:793-800.

Jantasuriyarat, C., M. Gowda, K. Haller, J. Hatfield, G. Lu, E. Stahlberg, B. Zhou, H. Li, H. Kim, Y. Yu, R. A. Dean, R. A. Wing, C. Soderlund, and G. L. Wang. 2005. Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. Plant Physiol. 138:105-115.

Jongeneel, C. V. 2000. Searching the expressed sequence tag (EST) database: planning for genes. Briefings Bioinform. 1:76-92.

Kantety, R. V. , M. L. Rota, D. E. Matthews, and M. E. Sorrells. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. Plant Mol. Biol. 48:501-510.

Kohchi, T., K. Fujishige, and K. Ohyama. 1995. Construction of an equalized cDNA library from *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 8:771-776.

Lepš, J., and P. Šmilauer. 1999. Multivariate Analysis of Ecological Data. Faculty of Biological Science. Univ. South Bohemia, Ceske Budejovice. 110 pp.

Liang, M. 2005. Review of researches on inheritance and breeding of blast resistance in rice. Chinese Agric. Bull. 21:341-345. (in Chinese with English abstract)

Liu, M. Y., Y. J. T. Zeng, and C. N. Sun. 1981. Diamondback moth resistant to several synthetic pyrethroids. J. Ecol. Entomol. 74:393-396.

Lu, H. Y., C. T. Chen, Y. C. Chiu, C. T. Lu, and M. L. Wei. 2006. An automated system for EST functional analysis and its application in rice genes. p.77-78. *in* the Bioinformatics in Taiwan Symposium and Workshop. Bioinformatics Soc. Taiwan. Taichung.

Mewes, H. W., D. Frishman, K. F. X. Mayer, M. Münsterkötter, O. Noubibou, P. Pagel, T. Rattei, M. Oesterheld, A. Ruepp, and V. Stümpflenand. 2006. MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes in 2005. Nucleic Acids Res. 34:169-172.

Okasanen, J. 2004. Multivariate Analysis in Ecology-Lecture Notes. p.63-70. Department of Biology, Univ. Oulu, Oulu, Finnish.

Polymeropoulos, M. H., H. Xiao, J. M. Sikela, M. Adams, J. C. Venter, and C. R. Merril. 1993. Chromosomal distribution of 320 genes from a brain cDNA library. Nat. Genet. 4:381-386.

Rauyaree, P., W. Chol, E. Fang, B. Blackmon, and R. A. DEAN. 2001. Gene expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Mol. Plant Pathol. 2:347-354.

Rounsley, S. D., A. Glodek, G. Sutton, M. D. Adams, C. R. Somerville, J. C. Venter, and A. R. Kerlavage. 1996. The construction of *Arabidopsis* expressed sequence tag assemblies. A new resource to facilitate gene identification. Plant Physiol. 112:1177-1183.

Rudd, S. 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequence? Trends Plant Sci. 8:321-329.

Sasaki, T., T. Matsumoto, K. Yamamoto, K. Sakata, T. Baba, Y. Katayose, J. Wu, Y. Niimura, Z. Cheng, Y. Nagamura, B. A. Antonio, H. Kanamori, S. Hosokawa, M. Masukawa, K. Arikawa, Y. Chiden, M. Hayashi, M. Okamoto, T. Ando, H. Aoki, K. Arita, M. Hamada, C. Harada, S. Hijishita, M. Honda, Y. Ichikawa, A. Idonuma, M. Iijima, M. Ikeda, M. Ikeno, S. Ito, T. Ito, Y. I. Ito, A. Iwabuchi, K. Kamiya, W. Karasawa, S. Katagiri, A. Kikuta, N. Kobayashi, I. Kono, K. Machita, T. Maehara, H. Mizuno, T. Mizubayashi, Y. Mukai, H. Nagasaki, M. Nakashima, Y. Nakama, Y. Nakamichi, M. Nakamura, N. Namiki, M. Negishi, I. Ohta, N. Ono, S. Saji, K. Sakai, M. Shibata, T. Shimokawa, A. Shomura, J. Song, Y. Takazaki, K. Terasawa, K. Tsuji, K. Waki, H. Yamagata, H. Yamane, S. Yoshiki, R. Yoshihara, K. Yukawa, H. Zhong, H. Iwama, T. Endo, H. Ito, J. H. Hahn, H. I. Kim, M. Y. Eun, M. Yano, J. Jiang, and T. Gojoboriand. 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. Nature 420:312-316.

Shim, K. S., S. K. Cho, J. U. Jeung, K. W. Jung, M. K. You, S. H. Ok, Y.S. Chung, K. H. Kang, H. G. Hwang, H. C. Choi, H. P. Moon, and J. S. Shin. 2004. Identification of fungal (*Magnaporthe grisa*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). Plant Cell Rep. 22:599-607.

Song, H. C., and X. Q. Shi. 2006. The relationships of changes in antioxidant enzymes of rice seeding infected by *Magnaporthe grisea* to the blast resistance. Nat. Sci. J. Hainan Univ. 24:378-382. (in Chinese with English abstract)

Statsoft Inc. 2002. STATISTICA: The Small Book Chinese Version. USA. 144 pp.

Tan, Q., K. Brusgaard, T. A. Kruse, E. Oakeley, B. Hemmings, H. Beck-Nielsen, L. Hansen, and M. Gaster. 2004. Correspondence analysis of microarray time-course data in case-control design. J. Biomed. Inform. 37:358-365.

Tekaia, F., Y. Edouard, and D. Bernard. 2002. Amino acid composition of genomes, lifestyles of organisms, and evolutionary trends: a global picture with correspondence analysis. Gene 297:51-60.

Tyagi, A. K., J. P. Khurana, S. Khurana, A. Gaur, A. Kapur, V. Gupta, D. Kumar, V. Ravi, S. Vij, P. Khurana, and S. Sharma. 2004. Structural and functional analysis of rice genome. J. Genet. 83:79-99.

Umeda, M., C. Hara, Y. Matsubayashi, H. H. Li, Q. Liu, F. Tadokoro, S. Aotsuka, and H. Uchimiya. 1994. Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. Plant Mol. Bio1. 25:469-478.

Wei, M. L., C. T. Lu, and H. Y. Lu. 2005a. Research and development of expressed sequence tag (EST) in cereal crops. Sci. Agric. 53(1,2):15-21. (in Chinese)

Wei, M. L., H. Y. Lu, and C. T. Lu. 2005b. Bioinformatics collection and statistics of rice disease / pest resistance genomics research. Crop Environ, Bioinform. 2:295-306. (in Chinese with English abstract)

Zhang, S., B. Huang, X. F. Xia, and Z. R. Sun. 2007. Bioinformatics research in subcellular localization of proteins. Progress Biochem. Biophy. 34:573-579. (in Chinese with English abstract)

Comparative Analysis of Expressed Sequence Tag (EST) in Rice Induced by *Magnaporthe grisea*[1]

Hsiu-Ying Lu[2,4], Yi-Chia Chiu[3], Cheng-Tao Chen[2], Meng-Li Wei[2] and Chun-Tang Lu[2]

Abstract

Lu, H. Y., Y. C. Chiu, C. T. Chen, M. L. Wei, and C. T. Lu. 2007. Comparative analysis of expressed sequence tag (EST) in rice induced by *Magnaporthe grisea*. J. Taiwan Agric. Res. 56:261-280.

Rice blast is caused by fungus pathogen *Magnaporthe grisea*, which is a major destructive disease in rice production worldwide. Expressed sequence tag (EST) is the fragment of cDNA sequence. Direct study of EST is therefore helpful to obtain the gene expression information. In order to investigate the differences of gene expression patterns of rice among varieties, tissues and developmental stages after rice-blast infection, we made a comparative analysis of rice ESTs induced by *M. grisea* from 14 cDNA libraries in NCBI-dbEST database. For each individual library, EST functional annotation, classification and representation statistics were performed. Clustering analysis and correspondence analysis were also used to detect the differences in gene expression patterns among libraries and identify the functional categories involved. Results showed that wild rice infected by *M. grisea* exhibited more transcripts involved in metabolism, cell growth / morphogenesis, subcellular localization and transport facilitation compared to indica rice and japonica rice. The representation of genes associated with metabolism and energy functions in infected rice leaf at mature stage was highest, followed by tillering stage, seedling stage. When rice ESTs induced by *M. grisea* were mixtures of sequences with different rice varieties and tissues, it appeared diversity of gene expression from those of rice ESTs from single source. These findings will facilitate understanding of the resistance mechanisms against rice blast.

Key words: Rice, Rice blast, Expressed sequence tag, Functional annotation and classification, Statistics of gene representation, Clustering analysis, Correspondence analysis.

---

1. Contribution No.2301 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 29, 2007.
2. Respectively, Senior Researcher, Project Assistant, Assistant Researcher and Assistant Researcher, Crop Science Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Master, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan ROC.
4. Corresponding author, e-mail:iying@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23390528.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):281-288 (2007)

應用RAPD技術對荔枝品種遺傳變異性之研究[1]

李文立[2,3] 鄧永興[2] 林榮貴[2]

摘　　要

李文立、鄧永興、林榮貴。應用 RAPD 技術對荔枝品種遺傳變異性之研究。台灣農業研究 56:281-288。

以十三個荔枝品種爲材料，進行 RAPD 的片段分析。經篩選 200 個逢機引子後，選出 23 個引子所產生的 259 個條帶 (RAPD markers)，做爲十三個荔枝品種間的親緣關係評估之依據。並利用 Jaccard 氏的計算方法，求得不同樣品間的相似度；並利用 UPGMA 方法，建立其親緣關係圖。結果顯示參試的十三個荔枝品種可區分爲兩大群，其中玉荷包與三月紅最爲相似，並與竹葉、新興、糖薄、高雄早生等品種叢聚在指數 0.53 處，而沙坑小核、尙書淮、糯米滋、桂味、桂枝及黑葉等品種則成另一叢聚在指數 0.52 處，其中桂味與桂枝的相似度 100%，顯示這兩個品種可能爲同種異名。另外，就引子所產生條帶數而言，在 23 個引子中，以 UBC-199 產生 9 個條帶數爲最少，其次爲 OPE-06 及 OPG-01 產生 10 個條帶數，而 OPG-08 產生 26 個條帶數爲最多，平均每個引子可以產生 15 個條帶，從這些引子中篩檢出鑑別玉荷包品種的專一性條帶 7 條、鑑別糯米滋品種的專一性條帶 6 條、鑑定沙坑小核品種的專一性條帶 7 條、及鑑定高雄早生品種的專一性條帶 6 條、一個尙書淮品種的專一性條帶、四個新興品種的專一性條帶、一個竹葉品種的專一性條帶及兩個桂味及桂枝品種共有的專一性條帶，這些品種專一性的條帶將可供作不同荔枝品種鑑別用。

關鍵詞：遺傳變異、荔枝、逢機擴大多型性 DNA。

前　　言

荔枝原產於中國南部，在中國栽培歷史已經超過 2000 年。目前廣泛的分布在熱帶及亞熱帶區域，包括印度、馬來西亞、泰國、中國、澳洲、以色列、台灣、南非、美國等均有商業栽培 (Menzel 2002)，由於歷經長期的傳播，及跨越不同國度後語言文字的差異，往往造成名稱的改變，使部分荔枝栽培品種有同種異名或是異種同名的情形 (Menzel & Simpson 1990)。

台灣荔枝品種大多沿用早期自中國引入時的名稱，但因中國華南地區的荔枝品種名稱也頗爲混亂，目前在嘉義農業試驗分所與鳳山熱帶園藝試驗分所已建立種源庫並保存共有 47 個品種的種原，但因形態分類不易，致使同一品種的變異品系無法分辨，造成育種及種原保存上的困難。

此外，荔枝大多利用無性繁殖，有關荔枝的枝條變異頻率及遺傳的研究，目前尙付之闕如，欲進行荔枝的品種改良，必須先了解其遺傳變異性，因此，各品種間遺傳的歧異程度，確實有探討的

1. 行政院農業委員會農業試驗所農業研究報告第 2302 號。接受日期：96 年 12 月 09 日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員、研究員及副研究員。台灣 高雄縣 鳳山市。
3. 通訊作者，電子郵件：leewenli@fthes-tari.gov.tw；傳真機：(07)7315590。

必要性。過去使用同功異構脢作為遺傳分析的工具，具有簡單快速的優點 (Degani *et al.* 1995; Mallikarjuna *et al.* 1995)，但是容易因取樣的組織部位、栽培技術及生長環境的差異，影響分析的結果。利用 DNA 增幅指紋技術以短序列引子進行基因組 DNA 增幅多型性進行偵測則有不易受環境影響等優點 (Williams *et al.* 1990; Gustave *et al.* 1991)，目前無性繁殖作物包括芒果 (Schnell *et al.* 1995)、菊花 (Wolff *et al.* 1995)、蘋果 (Landry *et al.* 1994) 及百合 (Yamagish 1995; Lee 1997) 等作物，均已利用 DNA 標誌分析遺傳親緣性，且獲得良好成果。因此，本研究目的在於建立荔枝 DNA 增幅指紋多型性圖譜，以提早評估種源的蒐集與利用之效率，提高育種效率。

材料與方法

供試荔枝材料

本研究中所使用之荔枝種原材料除了沙坑小核為嘉義縣竹崎鄉沙坑村選出之品種之外，均為台灣最早期由中國大陸地區所引進之荔枝品種，保存於鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹種原保存園，均為成齡且經型態鑑定之種原，計有玉荷包、高雄早生、三月紅、黑葉、糯米滋、竹葉、尙書淮、新興、桂味、桂枝、沙坑小核、六月雪及糖薄等十三個荔枝品種，並以粉殼種龍眼為外源對照。

DNA 萃取分法

DNA 的萃取過程概要如下：取荔枝植株嫩葉 0.15 g，加適量液態氮於研缽中磨碎後，加入適量 PVPP，以 1 mL 萃取液 (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM NaCl, 80 mM EDTA-Na_2, 10 mM, 2-mercaptoethanol 0.1% (v / v) , sodium sarkosyl 2% (w / v))，置於 65℃ 水浴 10 min，之後以 12,000 rpm 離心 10 min，取上澄液，注入新離心管中，並加入 5 µL RNase A (5 mg / mL) 並保持在 37℃ 20 min，去除 RNA 後，加入 600 µL 酚／氯仿 (pheno / chloroform) 混合液，去除蛋白質，離心後取上澄液，添加 0.6 倍體積的異丙醇 (isopropanol)，在室溫下進行 DNA 沉降，至少 20 min，離心後，倒除異丙醇後，以 70%酒精清洗兩次，風乾後，加入適量的 1 X TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA-Na_2) 並使 DNA 完全溶解後，置於 -20℃下 儲存備用。

PCR 條件

聚合酵素連鎖反應溶液為 1 X PCR 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25℃, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% (w / v) Triton X-100)，dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP 各 200 µM。引子 (primer) 濃度為 2.5 µM，荔枝基因組 DNA 50 ng，0.5 U DNA polymerase (*Thermus brockianus*, DynaZyme™II)，總反應體積為 25 µL，所有溶液混合後，覆蓋上 50 µL 礦物油 (Sigma mineral oil M3516)，置於 PCR 儀 (ABI 2400) 進行反應。聚合酵素連鎖反應程式設定為 95℃，30 sec.、42℃，60 sec.、72℃，90 sec.，總共進行 40 次循環，最後以 72℃，600 sec. 使反應完全。待反應結束後，加入 2.5 µL 的 10 X sample loading dye (1.0 mM EDTA-Na_2, 0.4% bromophenol blue (w / v), 0.4% Xylene cyanol (w / v), 50% glycerol) 混合後，在 1.5%的瓊脂膠進行電泳分析，再以 ethidium bromide 染色，在 UV 燈下觀察並照相記錄。

逢機引子篩選

以 200 組逢機引子 (Operon f, g, h, y, aa 及 UBC kit 1) 作為初步的篩選，從其中選出 23 個引子進行實驗，各試驗重複 3 次。

資料分析

DNA 條帶圖譜依該條帶出現記爲 1，未出現記爲 0 的方式建立二維矩陣並依 Jaccard (1901) 所提之相似度計算公式計算各族群間的相似度，公式如下：Sm = N11 / (N-N00)，Sm：相似度，N11：兩親本共有之條帶，N：總條帶數，N00：兩親本都沒有的條帶數。叢群分析 (cluster analysis) 則利用 NTSYS 軟體計算各族群間的相似度並依 UPGMA 法統計兩兩族群間的遺傳距離並繪製成親緣關係樹狀圖 (dendrogram)。

結　　果

荔枝 DNA 萃取

荔枝全株均富含二次代謝物質及酚類化合物，在 DNA 萃取過程中容易氧化使 DNA 溶液成爲黑褐色 (Puchooa 2004)，一旦 DNA 溶液成爲黑褐色將會影響後續 PCR 試驗。本研究初期以酚及氯仿之萃取方式進行純化，所得到之 DNA 純度並不理想，在嘗試套袋及其他前處理及加入 PVPP 藥劑後，才使 DNA 的萃取工作得以順利進行。所得到的 DNA 以分光光度計量測其吸收光波 A260 及 A280 的比值可到達 1.8-2.0 之間，經換算後每克鮮重葉片可以萃取到約 500 ug 的基因組 DNA。

RAPD 條帶生成

從 200 條 10 個核甘酸的逢機引子中篩選獲得主要條帶清晰及重複性佳的引子共 23 個，這些引子總共產生 259 個條帶 (RAPD markers)，其中有 20 個條帶爲僅出現在某一品種的專一性條帶，可以作爲不同品種的區分。在 23 個引子中平均每個引子可以產生 11.3 個條帶，其中以 UBC-199 產生 9 個條帶爲最少，以 OPG-08 產生 26 個條帶數爲最多，並由這些引子中篩檢出 8 個玉荷包品種專一性的條帶、6 個糯米滋品種專一性條帶、7 個沙坑小核品種專一性條帶、6 個高雄早生品種專一性條帶、1 個尙書淮品種專一性條帶、4 個新興品種專一性條帶、2 個黑葉品種專一性條帶、1 個竹葉品種專一性條帶及兩個桂味及桂枝品種共有的專一性條帶。這些不同品種的特異性條帶可以交互利用來鑑別出不同的荔枝品種（圖 1），亦可應用於這些品種的雜交後代之鑑別。

資料分析

將每一個 RAPD 的條帶當作是一個獨立的性狀，利用 NTSYS 套裝軟體進行分析，求得不同樣品間的遺傳相似度（表 1），並依照此表所列的不同樣品間的遺傳相似度，依 UPGMA 方法建立這 18 個荔枝的親緣關係圖（圖 2），結果顯示此 13 個品種，18 個荔枝樣品可以區分爲兩大群，其中玉荷包、三月紅、竹葉、新興、糖薄與高雄早生叢聚在指數 0.53 處，沙坑小核、尙書淮、糯米滋、桂味、桂枝及黑葉則成另一叢聚在指數 0.52 處，其中桂味與桂枝的相似度指數爲 1，亦即在 259 個 RAPD 條帶中每一個條帶均完全相同，顯示在鳳山分所保存的這兩個品種應爲同種異名或是在種源收集保存的過程中發生混淆，需要再一次的引種或是從其他保存園取樣以便進一步確定。

討　　論

荔枝 DNA 被認爲是比較困難萃取之植物種類，因其含有大量酚類化合物容易干擾核酸物質分離與純化，本研究中所採行之 DNA 萃取方式較 Puchooa 2004 提出之 CTAB 加入 PVP 的萃取方式所獲得的 DNA 在品質上與數量均較佳。在進行常規 RAPD 時，一般採用 37℃作爲 PCR 之鍊合溫度 (annealing temperature)，本研究中採 42℃相對嚴格的溫度條件，此溫度雖然會使部分條帶無法

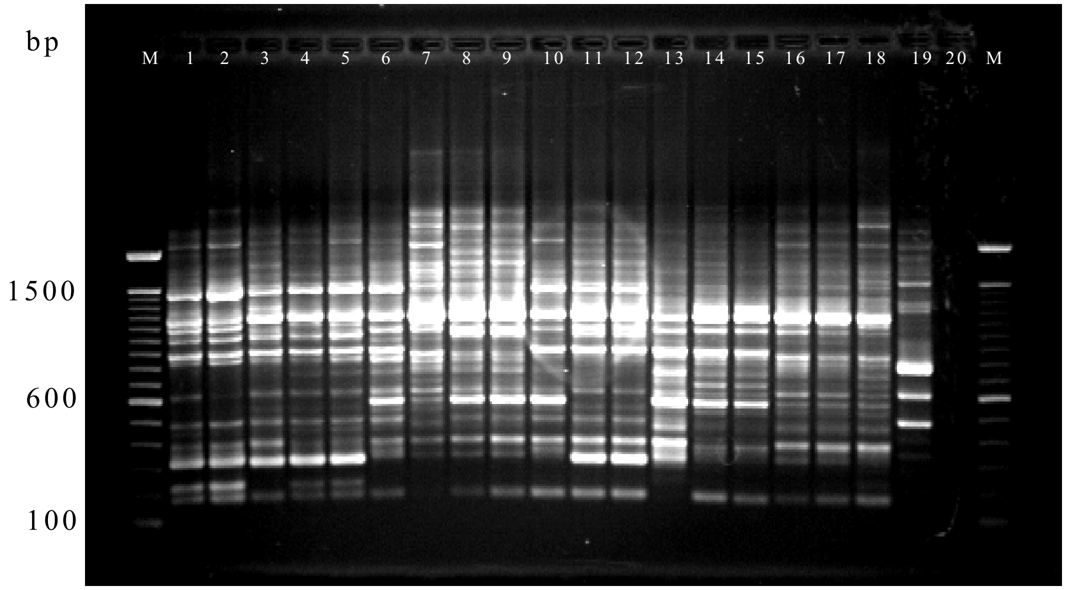


圖 1. 不同荔枝品種 DNA 樣本利用 OPG6 (GTGCCTAACC) 引子所顯示之圖譜。M 爲分子標記，每一條帶間隔 100 bp，1、2.玉荷包，3.三月紅，4、5.高雄早生，6.六月雪，7、8.沙坑小核，9.新興，10.黑葉，11，12.竹葉，13.糖薄，14、15.糯米滋，16.尙書懷，17.桂枝，18.桂味，19.龍眼，20.H_2O。

Fig. 1. RAPD profiles generated by Operon primer G6 in 1.2% agarose gel. (M, DNA maker; 1,2. Yu ho pao; 3. San yue hong; 4,5. Gao xiong zao sheng; 6. Liu yue xue; 7,8. Sha keng xiao ho; 9. Xin xing; 10. Hei yeh; 11, 12. Zhu yeh; 13. Tang bao; 14,15. No mi zi; 16. Shang shu huai; 17. Kwai zi; 18. Kwai wei; 19. Longan; 20. H_2O).

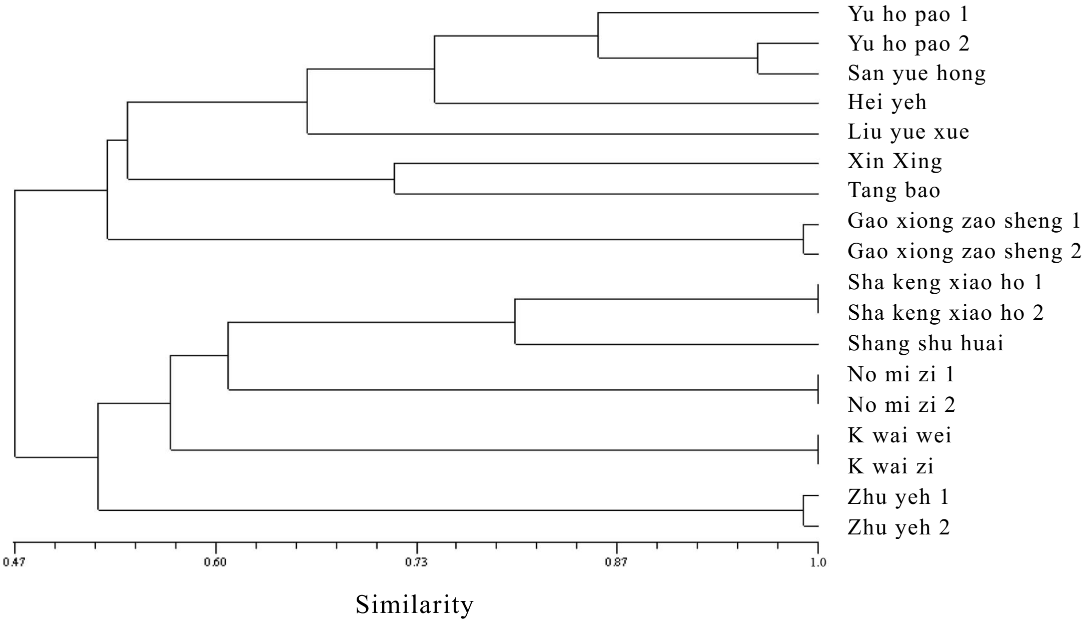


圖 2. 不同荔枝品種間的親緣關係圖。

Fig. 2. Relationships among different accessions of lychee via UPGMA analysis using Jaccard similarity analysis.

表 1. 依 Jaccard 公式計算荔枝 RAPD 條帶所求得之品種間的相似度

Table 1. Genetic similarity of RAPD banding patents among lychee varieties analyzed by Jaccard coefficient of similarity

	YHP-1z	YHP-2	SYH	GXZS-1	GXZS-2	LYX	SKXH-1	SKXH-2	XX	ZY-1	ZY-2	HY	TB	NMZ-1	NMZ-2	SSH	KZ	KW
YHP-1	1.00	0.89	0.86	0.57	0.57	0.65	0.49	0.49	0.52	0.53	0.53	0.73	0.55	0.39	0.39	0.47	0.40	0.40
YHP-2		1.00	0.97	0.60	0.60	0.70	0.52	0.51	0.52	0.56	0.56	0.76	0.59	0.41	0.41	0.50	0.40	0.40
SYH			1.00	0.58	0.58	0.70	0.53	0.52	0.53	0.54	0.54	0.74	0.58	0.42	0.42	0.49	0.40	0.40
GXZS-1				1.00	0.99	0.55	0.49	0.49	0.49	0.50	0.51	0.51	0.54	0.44	0.44	0.51	0.39	0.39
GXZS-2					1.00	0.56	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.51	0.54	0.44	0.44	0.50	0.39	0.39
LYX						1.00	0.58	0.57	0.56	0.50	0.51	0.64	0.63	0.44	0.44	0.54	0.40	0.40
SKXH-1							1.00	0.99	0.61	0.61	0.62	0.49	0.62	0.60	0.60	0.80	0.55	0.55
SKXH-2								1.00	0.61	0.62	0.62	0.49	0.62	0.60	0.60	0.80	0.55	0.55
XX									1.00	0.49	0.49	0.48	0.74	0.43	0.43	0.54	0.45	0.45
ZY-1										1.00	1.00	0.58	0.54	0.52	0.52	0.61	0.42	0.42
ZY-2											1.00	0.58	0.54	0.51	0.51	0.62	0.42	0.42
HY												1.00	0.56	0.40	0.40	0.49	0.40	0.40
TB													1.00	0.50	0.50	0.63	0.44	0.44
NMZ-1														1.00	1.00	0.64	0.59	0.59
NMZ-2															1.00	0.64	0.59	0.59
SSH																1.00	0.54	0.54
KZ																	1.00	1.00
KW																		1.00

z YHP, Yu ho pao; SYH, San yue hong; ZY, Zhu yeh; LYX, Liu yue xue; XX, Xin Xing; TP, Tang bo; GXZS, Gao xiong zao sheng; SKXH, Sha keng xiao ho; SSH, Shang shu huai; NMZ, No mi zi; KW, Kwai wei; KZ, Kwai zi; HY, Hei yeh.

被擴增，卻也使 RAPD 的穩定性與再現性獲得較好的表現 (Lee 1997)。在叢群分析 (cluster analysis) 中，玉荷包、三月紅、竹葉、新興、糖薄、高雄早生屬於同一群，而沙坑小核、尙書淮、糯米滋、桂味、桂枝及黑葉歸分爲同一群。此結果與 Viruel 以 12 個富含 CT 的微衛星區域進行 21 個荔枝品種遺傳分析之遺傳相似度從 0.23 至 0.93 的結果吻合 (Viruel & Hormaza 2004)。在這些荔枝品種 RAPD 條帶的分析結果顯示，不同來源的相同品種雖然在相似度尙有少許的差異性，但是在與其他品種比較後，統計結果顯示均被歸類爲最相近的一群，但是在分析其遺傳相似度時，不同來源的兩個玉荷包品種遺傳相似度僅達 89%，不同來源的竹葉、沙坑小核及糯米滋品種則分別爲 100%。爲釐清玉荷包品種間變異性，曾取樣 100 個不同個體的玉荷包荔枝，個別萃取其基因組 DNA 後進行遺傳分析結果卻顯示個體間無差異（相似度 100%），顯示本分所所蒐集不同來源的玉荷包品種顯然有混雜或變異的情形。此外，被歸類爲不同品種的桂味與桂枝荔枝卻在本研究中分析其遺傳相似度呈現 100%相同的情形（表 1）而這十三個荔枝品種間遺傳歧異度在 16%至 63%間，平均相似度爲 0.52±0.08 與梅樹品種間遺傳相似度介於 0.42-0.91 近似 (Wen *et al.* 2006)，除因荔枝爲異交作物，遺傳組成較複雜外，也顯示品種間的受到人爲選拔的影響較少。另外，由於荔枝採取嫁接、高壓等無性繁殖方法爲個體增加之方法，同品種的不同個體間可以視爲純系，因此不論來源的同一品種其遺傳背景應該完全相同，DNA 條帶型也應該完全一致，除非品種混淆與突變。

部分品種有不同參試個體，其中高雄早生品種兩個體間有 0.58%的差異性及竹葉品種兩個體間有 0.5%的差異，應爲試驗上的機差而非品種混淆，而不同來源的糯米滋與沙坑小核在 259 個條帶均完全相同，遺傳相似度 100%，顯示無性繁殖的荔枝能夠保有個體間的同質性。較令人意外的是桂味與桂枝兩個不同的品種間遺傳相似度爲 100%，由於 DNA 指紋檢測技術的敏感度可以明顯區分兄弟株，因此本試驗中的這兩個品種應該是同一個品種而無疑慮，此結果顯示這兩個品種是同種異名，值得從事荔枝育種工作人員注意。

在本試驗中亦加入同屬無患子科的龍眼爲外源對照，其產生的 RAPD 條帶型與荔枝各品種間差異甚大，任何一組的引子均可在荔枝與龍眼表現出完全不同的引子條帶型。因基因組本身差異極大，因此並未將其數據統計分析，但是於試驗中的各個電泳圖均可以顯示龍眼與其他參試的荔枝品種明顯的不同。利用 RAPD 技術檢測荔枝基因組的變異性具有快速、有效的特性，除了可以儘早評估種原的收集成果（例如本試驗中桂枝與桂味是否同種異名或在品種收集與保存時發生混淆）以及在荔枝品種內是否已經有變異的產生，還可以評估不同荔枝品種間遺傳背景及瞭解其親緣性以供育種者參考，另外藉由 RAPD 標誌的篩選可以將品種特有的條帶轉換爲核酸定序增幅區域標誌 (Sequence Characterized Amplified Region markers, SCAR markers)，進一步強化試驗的專一性並簡化判讀與鑑定時間。

誌 謝

本試驗研究經費承行政院農業委員會補助及試驗期間鳳山熱帶園藝試驗分所同仁張鳳娥小姐、廖美惠小姐及陳先利先生盡心協助試驗工作，特此致謝。

引用文獻 (Literature cited)

Degani, C., A. Beiles, R. El-Batsri, M. Goren, and S. Gazit. 1995. Identifying lychee cultivars by isozyme analysis. J. Am., Soc. Hortic. Sci 120:307-312.

Gustavo, C. A., B. J. Bassam, and P. M. Gresshoff. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9:553-556.

Jaccard, P. 1901. Study of comparative distribution of flower in the porition of Aipes and Jura. (Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura.) Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 37:547-549.

Landry, B. S., R. Q. Li, W. Y. Cheung, and R. L. Granger. 1994. Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. Theor. Appl. Genet. 89:847-852.

Lee, W. L. 1997. Investigation on Morphological Variation and Analysis of Random Amplifical Polymorphic DNA (RAPD) for *Lilium formosanum* and *Lilium longiflorum* in Taiwan. Master dissertation. National Taiwan University. 109 pp. (in Chinese with English abstract)

Menzel C. 2002. The lychee crop in Asia and Pacific. FAO, Bangkok. 108 pp.

Aradhya M. K., L. K. Yee, F. T. Zee, and R. M. Manshardt. 1995. Isozyme variation in lychee. Scientia Horticulturae 63:21-35.

Puchooa. D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) African J. Biotechnol. 3:253-255.

Schnell, R. J., C. M. Ronning, and R. J. Knight Jr. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic reationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 90:269-274.

Viruel M. A., and J. I. Hormaza. 2004. Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (Litchi chinensis Sonn., Sapindaceae). Theor Appl Genet 108:896-902.

Wen I. C., C. Y. Chang, and W. T. Shaw. 2006. Evaluation and phylogeny of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. germplasm by using RAPD analysis. J. Agric. Res. Taiwan 55:250-261. (in Chinese with English abstract)

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucliec Acids Res. 18:6531-5653.

Wolff, K., E. Zietkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447.

Yamagishi, M. 1995. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. Theor. Appl. Genet. 91:830-835.

Using RAPD Markers to Study Genetic Variation among Lychee Cultivars[1]

Wen-Li Lee[2,3], Yung-Shing Teng[2] and Rong-Quey Lin[2]

Abstract

Lee, W. L., Y. S. Teng, and R. Q. Lin. 2007. Using RAPD markers to study genetic variation among Lychee cultivars. J. Taiwan Agric. Res. 56:281-288.

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to identify the genetic relationship among introduced lychee cultivars in this study. Among 200 different decamer primers, 23 primers were selected; the selected primers amplified a total of 259 DNA bands. The total number of amplified bands per primer varied from 9 (UBC-199) to 26 (OPG-08), on an average 11.3 bands were induced by each primer. Jaccard's similarity coefficients for interval measure within and between cultivars were used to produce a cluster diagram using the unweighted pair-group method (UPGMA). The results showed that eighteen samples from thirteen lychee cultivars could be divided into two major groups:one included Yu ho pao, San yue hong, Zhu yeh, Xin xing, Liu yue xue, Tang bo and Gao xiong zao sheng; the other included Sha keng xiao ho, Shang shu huai, No mi zi, Kwai wei, Kwai zi and Hei yeh. The Jaccard's similarity coefficient of Kwai wei and Kwai zi was 1.00, implying that Kwai wei and Kwai zi may be the same cultivar. From 259 RAPD marker bands, we discovered 8 specific bands for Yu ho pao, 6 for No mi zi, 7 for Sha keng xiao ho, 6 for Gao xiong zao sheng, 1 for Shang shou huai, 4 for Xin xing, 2 for Hei yeh, 1 for of Zhu yeh and 2 for Kwai wei (Kwai zi). Those specific single bands of different cultivars will be recovered from agarose gel and cloned into TA vector system for sequencing, in order to develop new specific primer sets for the use of identifying different cultivars and hybrid posterity.

Key words: Genetic variation, Lychee, RAPD markers.

---

1. Contribution No.2302 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 9, 2007.
2. Assistant Horticulturist, Senior Horticulturist and Associate Horticulturist. FengShan Tropical Horticultural Experiment Station, ARI, FengShan, Taiwan, ROC.
3. Corresponding author, e-mail:leewenli@fthes-tari.gov.tw; Fax:(07)7315590.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):289-297 (2007)

台灣原生山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 大果種原之選拔[1]

宋家瑋[2] 陸明德[2] 歐錫坤[2,3]

摘　　要

宋家瑋、陸明德、歐錫坤。2007。台灣原生山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 大果種原之選拔。台灣農業研究 56:289-297。

台灣原生山櫻花所結果實鮮紅美麗，卻偏小苦澀，僅供觀賞櫻花，果實經濟價值不高。本研究目的主要採取野外種原選拔來改進山櫻花的果實大小與提升經濟效益。於結果期間赴阿里山、霧社、南庄、烏來與陽明山等地進行選拔優良大果山櫻花單株，各地單株果重平均變異範圍為 0.36-1.33 g；果肉變化率為 63.8-86.1%；可溶性固形物變化範圍為 7.4-19.0 °Brix；可滴定酸度變化範圍為 0.52-3.00%。已初選 8 個優良單株，將進一步評估與利用。

關鍵詞：山櫻花、田間選拔、果實性狀。

前　　言

台灣產李亞科 (Prunoideae) 植物以山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 最為常見，主要分布於中國南部、琉球、日本及越南，台灣的山櫻花生長與分布遍及台灣海拔 300-2,000 m 間的闊葉林林中，開花及果實成熟時極具觀賞價值，在台北陽明山、新竹、苗栗、南投、屏東及台東等廣為栽植。據台灣維管束植物簡誌 (Liu *et al*. 2000) 的描述：山櫻花屬於落葉喬木，可高至 10 m 以上；葉倒卵形至長橢圓狀橢圓形，先端漸尖，密重鋸齒緣、光滑；花先葉開放，花單生或數朵簇生於葉腋，下垂，花瓣卵圓形共 5 片，緋紅色 (Red purple)，微凹；果實卵形，紅色，長 1.5 cm。山櫻花在自然界中經長期演化，產生了不少變種，最著名的就是重瓣山櫻花 (*P. campanulata* Maxim. cv. polypetalous)，重瓣種不會結種子。此外尚有紅色濃淡不同的諸多變異，花期早晚，以及需冷量 (chilling requirement) 高低不同的單株出現 (Ou & Chen 2002)。在台灣山櫻花為一理想的平地與淺山坡地木本觀賞植物，果實經濟價值不高，若能從不同地區的種原進行果實性狀調查，篩選大果、低酸、質優、低需冷量的理想單株加以繁殖推廣，使其兼具觀賞與食用價值，將可提升此一台灣原生植物的經濟效益，是為本試驗研究的主要目的。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2299 號。接受日期：96 年 10 月 3 日。
2. 本所作物組助理研究員、約聘助理及研究員兼組長。台灣 台中縣。
3. 通訊作者，電子郵件：skou@wufeng.tari. gov.tw；傳真：(04)23399544。

材料與方法

山櫻花大果種原單株選拔

於阿里山、霧社、南庄、烏來、陽明山等地區進行實生山櫻花單株選拔，於花期開始標示早花單株，當結果期果實約 8-9 分熟時採收，並計算果實發育日數（從盛花期至果實採收間的日數）。以株為單位，收集後調查 50 粒果實單粒果重、種子重、果肉率（果重－種子重／果重x100%），以攜帶式色差計 (Colorimeter NF-333, Japan) 於赤道部位測定果皮顏色，果皮顏色以 Lab 表色法（即 Uniform Lightness Chromaticness Scale）表示，取其平均值。可溶性固形物以 Atago 數字型糖度計測定，可滴定酸度測定以蘋果酸滴定為計算標準，每一單株果實分三批測定糖、酸度，但少數單株果實數目不足 50 粒者，則未測定可溶性固形物及酸度。

阿里山地區於台 18 公路沿線進行調查，於 93 年 1 月上旬調查早花單株，4 月中、下旬採收果實，調查果重、種子重與果肉率，共 39 株。烏來地區於 93 至 95 年 1 月下旬調查早花單株，於 93 年 3 月下旬至 4 月中旬、94 年 4 月下旬、95 年 3 月中下旬前往西羅岸路與環山路收集山櫻花的果實，三年累計採收 59 株。陽明山地區於 94 年 4 月上旬於台北市政府建設局菁山苗圃收集山櫻花果實；95 年 1 月下旬調查單株開花早晚，3 月下旬、4 月上旬於北投區大屯里復興三路、菁山苗圃收集山櫻花果實，兩年共計採收 35 株。霧社地區於台 14 埔霧公路沿線與仁愛國中校內進行調查，94 年 1 月下旬調查開花情形，3 月下旬採收果實；95 年 1 月下旬調查開花情形，3 月中、下旬採收果實，兩年累計採收 41 株。南庄地區於縣道 124 沿路進行調查，94 年 1 月下旬調查開花情形，3 月下旬採收果實；95 年於 1 月下旬調查開花情形，3 月中旬至 4 月上旬採收果實，兩年共計採收 46 株。

結　果

各地區果實發育日數調查

陽明山地區山櫻花 95 年的盛花期約在 1 月 31 日至 2 月 23 日，果實採收日期為 3 月 24 日至 4 月 22 日，果實發育日數為 52 至 66 天。烏來地區西羅岸路盛花期約在 1 月 10 日至 2 月 2 日，果實於 3 月 18 日至 3 月 25 日成熟，果實發育日數為 44-74 天。霧社地區盛花期約在 1 月 25 日至 2 月 16 日，果實於 3 月 16 日與 23 日採收，果實發育日數為 50-57 天。南庄地區盛花期在 1 月 24 日至 2 月 24 日，採收日期為 3 月 17 日，果實發育日數為 47-57 天（表 1）。綜合上述資料，顯示台灣山櫻花種原果實於花後 44-74 天成熟。

表 1. 2006 年台灣不同地區山櫻花的開花結果性狀調查

Table 1. The phenological periods of *Prunus campanulata* located in different regions of Taiwan in 2006

Location	Full bloom	Fruit harvest	FDP ^{z} (days)
Yangmingshan	1/31-2/23	3/24-4/22	52-66
Wulai	1/10-2/2	3/18-3/25	44-74
Nanjhuang	1/24-2/24	3/17-4/12	47-57
Wushe	1/25-2/16	3/16-3/23	50-57

^{z} FDP (Fruit development period):from full bloom to first commercial harvest.

山櫻花大果種原選拔

93 至 95 年間從台灣不同地區所調查的山櫻花植株共有 220 株，其性狀調查結果詳如表 2，平均果重以北部陽明山地區最高達 0.84 g，中部霧社地區最輕爲 0.56 g。烏來地區採集的果實爲最大達 1.84 g，最小果的單株來自霧社僅 0.18 g。以阿里山地區和陽明山地區所採集的平均種子重爲最高達 0.16 g，霧社地區最輕爲 0.12 g。阿里山地區平均果重並不高，但種子重卻最重，故其果肉率爲最低僅 73.7%。各地區果實長度平均在 11.1-12.1 mm 之間，寬度則在 8.7-10.2 mm 之間。果皮 L 值（亮度）介於 25.29-28.24 之間，a 值（紅色）介於 11.51-17.09 之間；b 值（黃色）介於 5.58-9.17 之間，由這些數據顯示，霧社地區山櫻花果皮亮度最高，黃色成分亦較高；陽明山地區果皮亮度較暗，黃色成分最少。可溶性固形物介於 10.7-12.9 °Brix 之間，不同地區相差 2.2 °Brix 之多。5 個不同地區可滴定酸度的範圍爲 1.1-1.7%，相差 0.6%（表 2）。

台灣 5 個不同地區，93 至 95 年共調查 220 株山櫻花果實，據調查結果平均果重範圍爲 0.21-1.40 g 之間，將果重每 0.2 g 分爲一個等級，共分爲 7 個級距，以推算各地區果實重量的分布頻率，結果顯示，級距最大 1.21-1.40 g 的大果山櫻花出現在烏來與陽明山兩地，分布頻率爲 1.4%；分布最頻繁的爲果重 0.61-0.80 g 與 0.81-1.00 g 兩等級，頻率各爲 36.4%。最小果等級的分布頻率爲 0.5%出現在南庄地區（表 3）。

94 至 95 年間調查總株數 158 株，將每株最大果重逐一調查統計分布比率，結果顯示其分布範圍爲 0.21-2.00 g 之間，以果重級距 0.61-0.80 g 的分布比率 31.0%爲最高，果重≧1.41 g 以上所佔的分布比率共計 3.8%。果重＜0.60 g 以下的分布比率爲 10.1%（表 4）。

至於最小果重的分布範圍較窄，在 1.2 g 以下，可分爲 6 個級距，以級距 0.41-0.60 g 的 46.2%分布比率佔最多數。0.40 g 以下的分布比率約 21%。果重 1 g 以上的分布比率僅 0.6%（表 5）。

果肉率調查所得範圍約在 60-90%之間，若將每 5%分爲一等級，以探討 5 個不同地區的果肉率高低分布比率，結果顯示各地區果肉率以級距 76-80%的比率分布最多達 39.5%，86-90%級距的分布比率 1.4%爲最低（表 6）。

在果實品質分析方面，有 7 個單株樣品所採果實不足，不進行果品分析外，可溶性固形物的分布範圍在 3.0-19.0 °Brix 之間，若以每 2 °Brix 爲一級距，可分爲 8 個等級，由統計結果顯示分布比率以 11.1-13.0 °Brix 之級距爲最高，達 32.5%，可溶性固形物達 17.1-19.0 °Brix 最高等級的分布頻率達 5.3%，在 7.0 °Brix 以下者共有 3.3%（表 7）。

果實可滴定酸度的分布範圍在 3.0%以下，每 0.5%爲一等級可分爲 6 等級。分布最廣泛的級距爲 1.01-1.50%，達 39.0%。最高酸度等級爲 2.51-至 3.00%也有 4.8%的分布，酸度低於 1.0%的分布比率共達 32.9%（表 8）。

各不同地區採集的山櫻花果實，根據單株平均果重、最大果重、果肉率、可溶性固形物及可滴定酸等特性好壞綜合評估並篩選優選山櫻花植株，每個地區以選拔 2 株爲原則，選拔結果如表 9。

討　　論

山櫻花果實成熟期的早晚

陽明山、烏來、南庄、霧社等地區山櫻花的盛花期約在 1 月上旬至 2 月下旬，果實採收期約在 3 月中旬至 4 月下旬，果實發育日數約 44-74 天（表 1），據此可將山櫻花果實成熟期的早晚概分爲早、中、晚三期，早熟單株果實發育日數約 45 天，中熟單株果實發育日數約 60 天，晚熟單株果實發育日數約 75 天。

表 2. 台灣各地區山櫻花果實性狀調查

Table 2. Fruit characteristics of *Prunus campanulata* located in different regions of Taiwan

Location	No. of trees	Fruit weight (g)	Max. fruit weight (g)	Min. fruit weight (g)	Seed weight (g)	Flesh Propor-tion (%)	Fruit length (mm)	Fruit width (mm)	Fruit skin color			Soluble solids (°Brix)	Acidity (%)[z]
									L	A	b		
Yangmingshan	35	0.84	1.77	0.43	0.16	80.1	12.1	10.2	25.29	11.51	5.58	10.7	1.1
Wulai	59	0.72	1.84	0.28	0.14	80.1	11.7	10.2	25.91	12.52	6.25	12.9	1.7
Nanjhuang	46	0.67	1.65	0.22	0.14	78.1	11.7	9.6	27.41	17.09	8.73	11.8	1.2
Wushe	41	0.56	1.16	0.18	0.12	78.2	11.1	8.7	28.24	12.67	9.17	12.6	1.3
Alishan	39	0.60	0.86	0.30	0.16	73.7	—	—	—	—	—	—	—

[z] Acidity is calculated as percent of malic acid.

表 3. 台灣不同地區單株山櫻花果實平均重量分布頻率

Table 3. Frequency distribution of mean fruit weight of *Prunus campanulata* trees located in different regions of Taiwan

Mean fruit weight [z](g)	Yangmingshan	Wulai	Nanjhuang	Wushe	Alishan	Sum	Frequency (%)
0.21-0.40	0	0	1	0	0	1	0.5
0.41-0.60	1	2	17	5	5	30	13.6
0.61-0.80	15	14	17	22	12	80	36.4
0.81-1.00	15	24	9	12	20	80	36.4
1.01-1.20	3	17	2	2	2	26	11.8
1.21-1.40	1	2	0	0	0	3	1.4
Sum	35	59	46	41	39	220	100.0

[z] Data were divided into 6 classes between 0.21 to 1.40 g, and width of each class is 0.20 g.

表 4. 台灣不同地區單株山櫻花最大果重分布頻率

Table 4. Frequency distribution of maximum fruit weight of *Prunus campanulata* trees located in different regions of Taiwan

Mean fruit weight [z](g)	Yangmingshan	Wulai	Nanjhuang	Wushe	Sum	Frequency (%)
0.21-0.40	0	0	0	1	1	0.6
0.41-0.60	0	2	4	9	15	9.5
0.61-0.80	2	6	22	19	49	31.0
0.81-1.00	16	13	10	6	45	28.5
1.01-1.20	9	8	8	6	31	19.6
1.21-1.40	6	4	1	0	11	7.0
1.41-1.60	1	1	0	0	2	1.3
1.61-1.80	1	1	1	0	3	1.9
1.81-2.00	0	1	0	0	1	0.6
Sum	35	36	46	41	158	100.0

[z] Data were divided into 9 classes between 0.21 to 2.00 g, and width of each class is 0.20 g.

表 5. 台灣不同地區單株山櫻花最小果重分布頻率

Table 5. Frequency distribution of minimum fruit weight of *Prunus campanulata* trees located in different regions of Taiwan

Mean fruit weight [z] (g)	Yangmingshan	Wulai	Nanjhuang	Wushe	Sum	Frequency (%)
0.00-0.20	0	0	0	2	2	1.3
0.21-0.40	0	5	8	18	31	19.6
0.41-0.60	15	14	26	18	73	46.2
0.61-0.80	14	15	8	3	40	25.3
0.81-1.00	6	1	4	0	11	7.0
1.01-1.20	0	1	0	0	1	0.6
Sum	35	36	46	41	158	100.0

[z] Data were divided into 6 classes between 0 to 1.20 g, and width of each class is 0.2 g.

表 6. 台灣不同地區單株山櫻花果實平均果肉率分布頻率

Table 6. Frequency distribution of fruit flesh proportion of *Prunus campanulata* trees located in different regions of Taiwan

Flesh proportion [z] (%)	Yangming shan	Wulai	Nanjhuang	Wushe	Alishan	Sum	Frequency (%)
60.0-65.0	0	0	1	1	2	4	1.8
65.1-70.0	0	0	2	0	6	8	3.6
70.1-75.0	2	4	7	8	15	36	16.4
75.1-80.0	17	22	18	16	14	87	39.5
80.1-85.0	16	31	17	16	2	82	37.3
85.1-90.0	0	2	1	0	0	3	1.4
Sum	35	59	46	41	39	220	100.0

[z] Data were divided into 6 classes between 60 to 90%, and width of each class is 5%.

表 7. 94-95 年台灣不同地區單株山櫻花果實平均可溶性固形物分布頻率

Table 7. Frequency distribution of soluble solids of *Prunus campanulata* trees located in different regions of Taiwan in 2005 to 2006

Soluble solids [z] (°Brix)	Yangmingshan	Wulai	Nanjhuang	Wushe	Sum	Frequency (%)
3.0-5.0	0	0	1	1	2	1.3
5.1-7.0	2	0	0	1	3	2.0
7.1-9.0	9	0	3	4	16	10.6
9.1-11.0	13	2	12	5	32	21.2
11.1-13.0	4	22	14	9	49	32.5
13.1-15.0	2	8	6	10	26	17.2
15.1-17.0	2	4	2	7	15	9.9
17.1-19.0	3	0	2	3	8	5.3
Sum	35	36	40	40	151	100.0

[z] Data were divided into 8 classes between 3.0 to 19.0 °Brix, and width of each class is 2 °Brix.

表 8. 台灣不同地區單株山櫻花果實平均可滴定酸度分布頻率

Table 8. Frequency distribution of titratable acid of *Prunus campanulata* trees located in different regions of Taiwan

Titratable Acid [z] (%)	Yangmingshan	Wulai	Nanjhuang	Wushe	Sum	Frequency (%)
0.00-0.50	2	0	0	0	2	1.4
0.51-1.00	12	5	14	15	46	31.5
1.01-1.50	16	13	15	13	57	39.0
1.51-2.00	5	9	7	6	27	18.5
2.01-2.50	0	4	2	1	7	4.8
2.51-3.00	0	4	0	3	7	4.8
Sum	35	35	38	38	146	100.0

[z] Acidity is calculated as percent of malic acid. Data were divided into 6 classes between 0 to 3%, and width of each class is 0.5%.

表 9. 台灣不同地區優選山櫻花果實特性調查

Table 9. Fruit characteristics of good selections of *Prunus campanulata* in different regions of Taiwan

Location	No. of trees	Fruit weight (g)	Max fruit weight (g)	Min fruit weight (g)	Seed Weight (g)	Flesh propo -rtion (%)	Fruit length (mm)	Fruit width (mm)	Fruit skin color			Soluble solids (°Brix)	Acidity (%)[z]
									L	A	b		
Yangmingshan	Y-20	1.2	1.4	0.9	0.2	83.3	13.4	11.4	22.7	3.6	1.5	17.1	0.9
	Y-23	0.8	1.0	0.7	0.2	78.5	12.7	10.2	22.8	0.7	0.5	19.0	0.6
Wulai	WL-7	1.3	1.4	1.1	0.2	80.8	14.3	12.2	20.4	7.8	3.0	15.1	0.9
	WL-23	0.9	1.8	0.6	0.2	78.0	12.1	11.0	21.9	4.3	1.0	13.2	2.5
Nanjhuang	N-3	1.0	1.2	0.8	0.2	81.3	13.1	10.7	20.3	2.9	1.2	17.7	0.6
	N-22	1.0	1.2	0.9	0.1	86.1	12.4	11.0	23.1	12.9	5.1	18.5	0.7
Wushe	W-22	1.0	1.2	0.7	0.2	83.4	11.3	9.9	21.4	1.7	0.8	16.8	0.6
	W-25	0.6	0.8	0.5	0.1	81.7	9.1	7.8	21.5	2.7	0.8	17.2	0.5

[z] Acidity is calculated as percent of malic acid.

山櫻花不同海拔分布與適地適種

93 年赴阿里山順著台 18 公路（海拔 1,800 m 以上）沿線調查早花山櫻花植株的花期與結果期，此後因考慮到海拔高度與需冷量多寡間的相互關係 (Ou & Song 1999; Ou *et al.* 2000)，據現有模式推估，其需冷量約爲 760 小時左右，而平地山櫻花的需冷量僅爲 190 小時而已 (Ou & Chen 2002)。因此將來若篩選到大果山櫻花的單株，勢必不適宜至中、低海拔或平地等地區繁殖推廣，因此 94 年以後便終止再去阿里山調查山櫻花大果種原。以期選拔的單株能適合中、低海拔能開花爲主要目標。

優質山櫻花的選拔條件

山櫻花果實特性調查包括果重、果實長與寬、種子重、果肉率、果皮的彩度與亮度、可溶性固形物含量以及可滴定酸等。因此各不同地區質優大果山櫻花的決選，以大果、高可溶性固形物與低酸，三大特性爲主要考量條件，其他特性較次要，考量未來育種規模與優選品系保存問題，每一地區選拔 2 單株，以爲大果山櫻花的優選株系（詳見表 9）。8 個優選單株將進一步評估與利用，而以烏來 WL-7 之綜合果實性狀較優越（圖 1）。

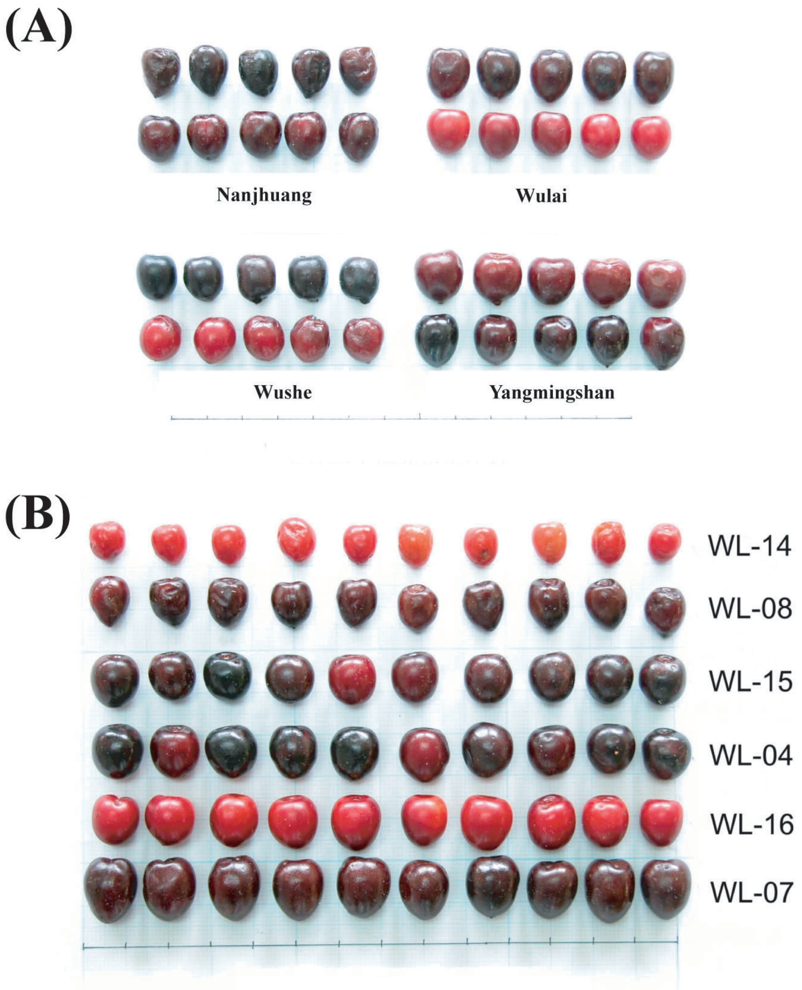


圖 1. 2006 年台灣低海拔地區所採收山櫻花果實之比較。(A)各地區採收山櫻花果實特性 (B)烏來地區單株果實，果重範圍介於 0.40 g (WL-14) 至 1.26 g (WL-7)。圖下方比例尺每刻度代表 1 cm。

Fig. 1. Fruit characteristics of *Prunus campanulata* collected from lowland regions of Taiwan in 2006.
(A) Four main distribution areas in Taiwan. (B) Fruit of individual trees in Wulai. Average fruit weight range from 0.40 g (WL-14) to 1.26 g (WL-7). Scale below shows 1cm in actual length.

山櫻花與甜櫻桃果實特性比較

Joublan 等人 (2005) 在智利南方評估 19 世紀初至中期德國殖民地開拓者所留下的甜櫻桃種原，其果重變化範圍爲 3.6-8.3 g、果實腎臟形、果梗長 3.6-5.7 cm。可溶性固形物分布範圍 11.7-28.8 °Brix，果肉淡黃色，少數紫色。果皮顏色變化從紅色至深紅色。其甜櫻桃種源果重約爲山櫻花的 7-10 倍，可溶性固形物爲 1.5 倍。在加拿大 Pacific Agri-Food Research Center 所保存的甜櫻桃栽培種，果實重量更達 9.2-11.3 g，可溶性固形物分布範圍 16.7-20.1 °Brix (Kappwl 2005)。山櫻花果實與其相較更覺渺小；但可溶性固形物含量差異較小。因此山櫻花與甜櫻桃若能進行屬間雜交，果實大小的改善潛力很大。

美國密西根大學的酸櫻桃育種計畫，優選品系可滴定酸範圍為 1.48-1.59% (Iezzoni *et al.* 2005)。在德國酸櫻桃優選品係可滴定酸的範圍約在 1.6-2.1% (Schuster & Wolfram 2005)。土耳其所選品系的酸度範圍 2.1-2.6% (Burak & Erbil 2006)。與山櫻花 0.52-3.00%的範圍相較，顯示出山櫻花有高酸與低酸的種源存在。

誌 謝

本研究承蒙林務局 92 至 94 年經費支持，劉明穗小姐、李淑敏小姐協助果品分析與文書處理，技工林海生先生、劉慶良先生、陳耿信先生協助調查與取樣，特表謝忱。

引用文獻 (Literature cited)

Burak, M., Y. Erbil, and K. Kaynas. 2005. Clonal selection of ‘Kutahya’ sour cherry. Acta Hort. 667:159-164.

Iezzoni, A. F., A. M. Sebolt, and D. Wang. 2005. Sour cherry breeding program at Michigan State University. Acta Hort. 667:131-134.

Joublan, J. P., H. Serri, and J. Ocampo. 2005. Evaluation of sweet cheery germplasm in Southern Chile. Acta Hort. 667:69-74.

Kappwl, F. 2005. New sweet cherry cultivars from Pacific Agri-Food Research Center (Summerland). Acta Hort. 667:53-57.

Liu, H. Y., Y. P. Yang, S. Y. Lu, and B. L. Shih, eds. 2000. Manual of Taiwan Vascular Plants (III). Council of Agriculture Pub. Taipei. 392 pp. (in Chinese)

Ou, S. K., and C. C. Chen. 2002. Chilling Requirement for native *Prunus campanulata* Maxim. in Taiwan. J. Agric. Res. China 51(1):25-32. (in Chinese with English abstract)

Ou, S. K., and C. W. Song. 1999. Performance of low-chill peaches in low-chill area of Taiwan. J. Chinese Soc. Hort. Sci 45(4):317-326. (in Chinese with English abstract)

Ou, S. K., M. F. Hwang, C. P. Li, S. J. Lu, and C. W. Song. 2000. The relationship between cultivar’s chilling requirement and planting altitudes of peaches. J. Agric. Res. China 49(3):46-53. (in Chinese with English abstract)

Schuster, M., and B. Wolfram. 2005. Sour cherry breeding at Dresden-Pillnitz. Acta Hort. 667:127-130.

Selection for Large Fruit of *Prunus campanulata* Maxim. Germplasm in Taiwan[1]

Chia-Wei Song[2], Ming-Te Lu[2] and Shyi-Kuan Ou[2,3]

Abstract

Song, C. W., M. T. Lu, and S. K. Ou. 2007. Selection for large fruit of *Prunus campanulata* Maxim. germplasm in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 56:289-297.

Prunus campanulata Maxim. is one of the native plants in Taiwan. The attractive fruits are red, small and astringent. It was only used for ornamental planting with low edible value. The objectives of this research are to improve the fruit size and economic value of *P. campanulata* Maxim. by natural field selection. Field selections were conducted at fruiting period in five lowland regions. Average fruit weight for 220 sampling trees ranged for 0.36 to 1.33 g, 63.8% to 86.1%. for flesh proportion, 7.4 to 19.0 °Brix for total soluble solid, and 0.5 to 3.0% for titratable acidity. Eight good selections were under evaluation and utilization.

Key words: *Prunus campanulata* Maxim., Field selection, Fruit characteristics.

1. Contribution No.2299 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted:October 3, 2007.
2. Assistant Horticulturist, Assistant, and Senior Horticulturist, respectively, Crop Science Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding author, e-mail:skou@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23399544.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):298-306 (2007)

砧木種類對茂谷柑植株生長、產量與品質的影響[1]

黃阿賢[2,4] 洪士程[3]

摘　要

黃阿賢、洪士程。2007。砧木種類對茂谷柑植株生長、產量與品質的影響。台灣農業研究 56:298-306。

在嘉義及雲林的三個試區進行茂谷柑之八種砧木試驗，調查植株生長、產量與果實品質至定植後第六或第七年。生育正常植株之產量以廣東檸檬及粗皮檸檬較高，枳殼及 Swingle 枳柚中等，酸橘及酸橙較低。果實品質在三個試區的表現甚相近，砧木間的主要差異為可溶性固形物及含酸量，枳殼及其雜交種 Troyer 枳橙、Swingle 枳柚之可溶性固形物及含酸量較高，酸橘及酸橙中等，雜交柚、廣東檸檬及粗皮檸檬最低。嘉義試區疫病與黃龍病發生嚴重，是影響植株生長與產量的主要因素，前者以酸橘及 Troyer 枳橙、後者以 Swingle 枳柚之感染率較高，是導致產量低的原因。

關鍵詞：茂谷柑、柑橘砧木、植株生長、產量、品質。

前　言

柑橘栽培普遍採用根砧，除 Eureka 檸檬以枳殼及其雜交種等為砧木之少數組合外 (Broembsen 1984; Ferguson 1990)，各柑橘品種與一般砧木間均具親和性。重要的柑橘砧木種類包括酸橙、粗皮檸檬、枳殼、枳橙、枳柚、廣東檸檬、酸橘、美女橘、柚類、甜萊姆及甜橙等等。一般柑橘之砧木試驗以甜橙、葡萄柚或寬皮柑居多。栽培上，根砧對植株的影響可歸納為 (1).植株生長勢之強弱。(2).果實品質與產量。(3).不同土壤之適應性。(4).病害的抵抗性。影響根砧的病害主要為疫病與線虫，以及南非立枯病、破葉病、鱗砧病等嫁接傳染病原 (Castle 1987; Hwang 2000; Newcomb 1978; Wutscher 1979)。茂谷柑屬橘橙 (Tangor)，砧木試驗甚少。

砧木對茂谷柑產量與品質之影響與甜橙或葡萄柚大致相似，但甜橙以 Palestine 甜萊姆作為砧木產量高，茂谷柑則產量低，美女橘作為甜橙或葡萄柚砧木產量不佳，但在茂谷柑則令人滿意 (Wheaton *et al.* 1991)。主要的砧木種類對茂谷柑果實品質並無顯著影響 (Figueiredo *et al.* 2006)，也有報告以廣東檸檬或 Volkameriana 為砧木時品質較差 (Ashkenazi 1992)。少數以 Swingle 枳柚為根砧之茂谷及特定甜橙品種的植株於十餘年後出現穗砧親和性的問題，此可能是多胚性之 Swingle 枳柚實生苗中，少數雜交後代遺傳因子重組所產生的結果 (Garnsey *et al*. 2001)。台灣新興柑橘品種中茂谷柑風味濃，最受歡迎，發展最迅速。目前台灣柑橘所使用之砧木種類仍少，主要是柚類、酸橘與廣東檸檬，絕大多數茂谷柑以後兩者砧木，然尚無相關的砧木試驗報告。本試驗調查不同砧木種類對茂谷柑果實產量、品質及植株生長的影響。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2303 號。接受日期：96 年 12 月 10 日。
2. 嘉義分所園藝系副研究員。台灣　嘉義市。
3. 嘉義分所植物保護系助理研究員。台灣　嘉義市。
4. 通訊作者，電子郵件：hwangas@dns.caes.gov.tw；傳真機：(05)2773630。

材料與方法

供試材料

茂谷柑接穗採自農試所嘉義分所健康種原，經例行檢定，均無黃龍病、破葉病 (citrus tatter-leaf) 及南非立枯病 (tristeza) 等病原。砧木種子除酸橘 (*Citrus sunki* Hort. ex Tan.) 取自新竹酸橘醬加工廠外，其餘廣東檸檬 (*C. limonia* Osbeck)、雜交柚 (*C. grandis* Osbeck)(麻豆文旦 x 紅文旦)、粗皮檸檬 (*C. jambhiri* Lush.)、Troyer 枳橙 (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* Raf.)、酸橙 (*C. auarantium* Linn.)、Swingle 枳柚 (*C. paradisi Macf.* x *P. trifoliata* Raf.)、枳殼 (*P. trifoliata* Raf.) 均採自嘉義分所果園。苗木均以盆栽培育，於砧木一年生時嫁接，嫁接後一年至一年半，各試驗園選擇苗木大小相近者定植。

試驗園與試驗設計

試驗園三處包括嘉義分所 (Chia-Yi Agricultural Experiment Station, CAES)、古坑鄉 A 區及古坑鄉 B 區。施肥、修剪、病蟲害防治等按一般柑園管理或推薦量。嘉義分所試區株行距為 4.5 × 3.0 m、古坑鄉 A 區 5.0 × 2.0 m、古坑鄉 B 區 5.5 × 4.0 m。前兩區有噴灌設施，後者採行間溝灌。嘉義分所及古坑鄉 A 區採完全逢機之試驗設計，每重覆一株。嘉義分所計 7 種砧木處理 10 重覆，古坑鄉 A 區計 5 種砧木處理 6 重複。古坑鄉 B 區計 8 種砧木，處理株數如表 7。各試區土壤性質與主要要素含量如表 1，與台灣中部地區柑橘園之土壤比較 (Shieh 1990)，嘉義試區鐵的含量與古坑鄉 B 試區錳的含量略偏低。

產量與果實品質調查

果實於成熟期間採收後，計算果實數與重量。果實品質分析採樹冠外圍、中間高度位置之中等果形者每株 12 果，調查果實品質主要項目，包括重量、皮厚、縱徑與橫徑。果實橫切後，以電動榨汁機 (Braun, MPZ6, USA) 榨汁，果汁重除以果實重為果汁率，總可溶性固形物含量以手提式曲折計 (Atago N1, Japan) 測定，含酸量以 0.1N NaOH 滴定，換算為每 100 mL 果汁中之檸檬酸 (citric acid) 含量。

黃龍病檢定

2003 年 3 月自植株上、下部位及四周逢機採 20 成熟葉片，取中肋置於 45℃烘箱中烘乾後，以 Hung (1999) 開發之 PCR 方法檢定黃龍病。

表 1. 各試驗區土壤分析

Table 1. Soil characters of the three trial zones used in the study

Site	Soil depth (cm)	pH	Organic matter (%)	Element concentration (mg/kg)					
				P	K	Ca	Mg	Fe	Mn
CAES	0-20	6.1	2.0	44	48	547	49	45	33
	20-40	5.8	1.5	38	70	930	92	42	21
Gu-Keng-A	0-20	6.6	1.5	40	98	1114	98	713	22
	20-40	6.1	1.3	27	40	551	62	417	20
Gu-Keng-B	0-20	5.3	2.0	67	116	461	129	254	16
	20-40	5.2	1.2	70	52	351	86	104	8

結　果

嘉義試區植株生育調查

嘉義試區植株於 1998 年 9 月定植，每處理 10 株。2001 年春分別有 3 株 Troyer 枳橙、2 株酸橘衰弱，有根部病害癥狀。此後陸續有其他植株發生根部病害。2002 年間試區中陸續發生新葉缺鋅、不規則黃化、葉脈木栓化之黃龍病病徵，其中以 Swingle 枳柚砧居多。至 2003 年春，Swingle 枳柚砧僅二株、酸橘砧僅一株爲健株（無黃化及枯梢癥狀），Troyer 砧者均有衰弱現象。2003 年 3 月以 PCR 法檢查全部植株，Swingle 枳柚砧感染黃龍病之比率最高達 80%，其他砧木亦分別有 2 至 4 株被感染（表 2）。爲研判土壤病害原因，逐株檢查土壤中之柑橘線蟲密度，結果與根部病害並無相關性（資料未列出），本試區試驗期間極少天牛危害，且對疫病爲耐病之酸橙與 Swingle 枳柚均無該病發生，由病癥判斷該根部病害是疫病菌造成之裾腐病或根腐病。2003 年春，植株生長狀況以酸橙、粗皮檸檬、廣東檸檬砧較佳，定植 10 株中分別有 7、6、5 株爲健株。

健株比率高的砧木，包括粗皮檸檬、酸橙、廣東檸檬等產量亦高。反之，罹病比率較高之酸橘、Swingle 枳柚與 Troyer 枳橙產量低（表 3）。Troyer 枳橙，平均單株產量，連續三年均最低。與其它兩試區比較，本試區產量明顯偏低。果實品質主要項目中果重、縱徑、橫徑、皮厚、果汁率在處理間均無顯著差異。可溶性固形物以 Swingle 枳柚之 12.0 ^{o}Brix 最高，粗皮檸檬及廣東檸檬兩者之 10.5 ^{o}Brix 較低；含酸量以 Swingle 枳柚之 0.69%及 Troyer 枳橙之 0.61%較高，雜交柚、粗皮檸檬、廣東檸檬較低，分別爲 0.54%、0.53%及 0.55%（表 4）。

古坑鄉 A 試區植株生育調查

古坑鄉 A 試區於 1998 年 7 月定植，其株距爲一般柑園之一半，栽培密度爲 1000 株／公頃，至 2001 年相鄰株之枝梢已漸接觸。定植 30 株中，僅 2 株粗皮檸檬砧者發生輕微裾腐病，但並未造成枝梢黃化等外觀異常現象。其餘植株生長良好。2002 及 2003 連續二年之結果量，以 Swingle 枳柚砧之平均每株 483.5 個果實、廣東檸檬砧之 463.8 個果實較多，Troyer 枳橙砧 453.3 個果實、粗皮檸檬砧 402.8 個果實次之，雜交柚砧最低爲 328.8 個果實（表 5）。處理間果實品質差異主要爲可溶性固形物與含酸量，五種砧木間，可溶性固形物以粗皮檸檬砧之 8.7 ^{o}Brix 略低，含酸量以粗皮檸檬及雜交柚砧者略低，分別爲 0.31%及 0.30%（表 6）。其他果實品質主要項目中果重、縱徑、橫徑、皮厚、果汁率在處理間均未達顯著差異。

表 2. 嘉義試區砧木對茂谷柑植株生長之影響 ^{z}

Table 2. Effect of different species of rootstocks on tree growth of ‘Murcott’ tangor at Chia-Yi Agricultural Experiment Station^{z}

Rootstock	No. trees		
	Healthy canopy	HLB ^{y}	Foot or root rot
Sour orange (*Citrus auarantium* Linn.)	7	3	0
Rough lemon (*C. jambhiri* Lush.)	6	3	2
Rangpur lime (*C. limonia* Osbeck)	5	3	2
Pummelo (*C. grandis* Osbeck)	3	4	4
Swingle (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* Raf.)	2	8	0
Sunki (*C. sunki* Hort. ex Tan.)	1	2	7
Troyer (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* Raf.)	0	2	8

^{z} Trees (10 trees per treatment) planted in 1998 and investigated till 2003.

^{y} Huanglongbing (HLB), trees detected positive by PCR in March, 2003.

表 3. 嘉義試區砧木對茂谷柑連續三年產量之影響 z

Table 3. Three-year's accumulative yield of 'Murcott' tangor grafted on seven species of rootstocks at Chia-Yi Agricultural Experiment Station[z]

Rootstock	Yield (kg/tree)			
	2002	2003	2004	total
Rough lemon	22.4 a [y]	32.9 a	24.0 ab	79.2 a
Pummelo	19.8 a	21.2 abc	34.1 a	75.1 a
Sour orange	19.5 a	17.6 bc	20.5 ab	59.8 a
Rangpur lime	18.4 a	29.1 ab	14.4 bc	61.8 a
Sunki	16.6 a	15.9 bc	16.5 bc	48.9 ab
Swingle	21.3 a	10.1 c	13.1 bc	44.4 ab
Troyer	2.5 b	9.8 c	3.5 c	15.7 b

[z] Trees (10 trees per treatment) planted in Sept. 1998.

[y] Means separation by Duncan's multiple rang test (p = 0.05).

表 4. 嘉義試區砧木對茂谷柑果實品質之影響 z

Table 4. Effect of different species of rootstocks on fruit quality of 'Murcott' tangor at Chia-Yi Agricultural Experiment Station[z]

Rootstock	Fruit weight (gm)	Diameter [y] (mm) Trans.	Diameter [y] (mm) Longit.	Rind thickness (mm)	Juice yield (%)	Total soluble solid (°Brix)	Acid content (%)
Swingle	191.4	75.4	57.9	3.1	48.0	12.0 a [x]	0.69 a
Troyer	196.7	75.9	60.5	3.2	47.0	11.3 ab	0.61 abc
Sour	198.4	75.8	60.0	3.1	46.1	11.2 ab	0.58 bc
Sunki	193.6	75.3	59.4	3.1	48.3	11.1 ab	0.57 bc
Pummelo	196.8	76.3	59.6	3.0	50.1	11.1 ab	0.54 c
Rangpur lime	200.4	76.6	59.4	3.1	48.2	10.5 b	0.53 c
Rough lemon	189.1	74.6	59.5	3.1	47.4	10.5 b	0.55 c

[z] Trees planted in 1998. Fruits harvested in Jan. 2003.

[y] Trans.: transversal; longit.: longitudinal.

[x] Means separation by Duncan's multiple rang test (p = 0.05).

表 5. 古坑 A 試區砧木對茂谷柑連續二年結果數之影響 z

Table 5. Effect of different species of rootstocks on yield of 'Murcott' tangor at the Gu-Keng, Yunlin A trail[z]

Rootstock	Yield (fruit/tree)		
	2002	2003	Total
Swingle	210.5 a [y]	273.0 a	483.5 a
Rangpur lime	183.0 ab	280.8 a	463.8 a
Troyer	219.8 a	233.5 ab	453.3 ab
Rough lemon	161.2 ab	241.6 ab	402.8 ab
Pummelo	143.1 b	185.7 b	328.8 b

[z] Trees planted in June 1998, six 1-tree replications.

[y] Means separation by Duncan's multiple rang test (p = 0.05).

表 6. 古坑 A 試區砧木對茂谷柑果實品質之影響 z
Table 6. Effect of different species of rootstocks on fruit quality of 'Murcott' tangor at the Gu-Keng, Yunlin A trail z

Rootstock	Fruit weight (gm)	Diameter y (mm) Trans.	Longit.	Rind thickness (mm)	Juice yield (%)	Total soluble solid (°Brix)	Acid content (%)
Troyer	197.1	77.4	60.1	3.3	54.6	9.2 a x	0.35 a
Pummelo	203.1	78.0	60.5	3.3	54.3	9.2 a	0.30 b
Swingle	201.9	78.0	59.5	3.2	54.6	9.1 a	0.35 a
Rangpur lime	195.9	77.4	59.5	3.4	54.0	9.1 a	0.32 ab
Rough lemon	194.2	76.9	60.5	3.4	53.0	8.7 b	0.31 b

z Trees planted in June 1998. Fruits harvested in Jan. 2003.
y trans.: transversal; longi.: longitudinal.
x Means separation by Duncan's multiple rang test (p = 0.05).

古坑鄉 B 試區植株生育調查

古坑鄉 B 試區於 2000 年 9 月定植計 75 株，供試砧木包括酸橘、廣東檸檬、雜交柚、粗皮檸檬、Troyer 枳橙、酸橙、Swingle 枳柚、枳殼等八種類。2003 年 6 月經病原檢定，全部植株均無黃龍病，生長正常；當年 12 月再檢定，有粗皮檸檬、酸橘砧各 1 株、枳柚砧 3 株感染黃龍病，部份枝梢出現病徵。酸橙砧者有 3 株經檢定雖無黃龍病，但有枯梢、葉片黃化徵狀，樹勢衰弱，判斷係感染南非立枯病 (Tristeza)，供試砧木中僅酸橙對該病爲感病 (Castle 1987; Newcomb 1978; Wutscher 1979)。此後至 2006 年秋，除上述 8 株外，其他植株外觀均正常。定植後第五至第七年 (2004 至 2006) 之產量合計，由高至低依次爲粗皮檸檬、廣東檸檬、枳殼、Swingle 枳柚、雜交柚、Troyer 枳橙、酸橙、酸橘。三年產量合計，粗皮檸檬最高平均每株 194.7 kg，酸橘最低爲 106.3 kg（表 7）。果實品質調查，2005 與 2007 年（後者資料未列出）兩年間之結果相似，枳殼砧之果重最小，雜交柚、廣東檸檬、粗皮檸檬砧果重較大；可溶性固形物與含酸量則以雜交柚、廣東檸檬、粗皮檸檬砧者較低；果汁率以雜交柚、粗皮檸檬砧較低（表 8）。

討　論

本試驗三個試區中，嘉義試區因發生黃龍病與疫病，砧木間之生育狀況有相當差異。黃龍病以枳柚砧發生比率達 80%最高，疫病以酸橘及 Troyer 枳橙發生較多，分別爲 70%及 80%（表 2）。古坑鄉 A 試區植株均無黃龍病病徵，古坑鄉 B 試區雖黃龍病發生較少，但感染率亦以 Swingle 枳柚砧 18%最高。目前尚無黃龍病之抗病品種，粗皮檸檬、柚類、甜萊姆、枳殼、檸檬相對稍爲耐病 (Cheema *et al.* 1982; Lange *et al.* 1985)。在田間，黃龍病由柑橘木蝨取食嫩芽而傳播 (Huang & Liaw 1995)。本試驗，Swingle 枳柚砧植株感染率高，可能因幼樹期生長較其他砧木旺盛、新芽較多而被易媒介昆蟲傳染。但此一現象若在全園均採用同一砧木並注意媒介昆蟲之防治時應不明顯。

嘉義試區，酸橘及 Troyer 枳橙兩砧木疫病發生比率高，酸橙與 Swingle 枳柚則無，古坑鄉 A 試區有兩株粗皮檸檬發生輕微裾腐病，古坑鄉 B 試區則無根部病害發生。與台灣疫病感病性檢定 (Ann 1989) 比較，其差異爲嘉義試區酸橘、Troyer 枳橙之疫病較粗皮檸檬發生嚴重，可能與田間病原分佈不均勻與檢定之苗較小有關。疫病爲重要柑橘病害，有本病發生之園區，應注意防範並避免再以酸橘做爲根砧。

表 7. 古坑 B 試區茂谷柑八種砧木累計產量之差異 [z]

Table 7. Accumulative yield of 'Murcott' tangor grafted on eight rootstocks at the Gu-Keng, Yunlin B trial [z]

Rootstock	Yield (kg / tree)				No. trees
	2002	2003	2004	total	(investigated / planted)
Rough lemon	69.4±14.7	76.3±15.1	49.0±27.2	194.7±43.3	12/12
Rangpur lime	69.3±27.1	77.9±21.5	43.4±15.7	190.6±56.3	10/10
Trifoliate	56.9±5.5	77.2±7.2	44.1±1.0	178.1±11.6	3/3
Swingle	54.8±16.5	74.8±12.2	31.1±14.0	162.9±28.9	12/16
Pummelo	57.0±11.2	35.9±3.7	43.9±6.7	136.9±12.7	3/3
Troyer	45.5±19.2	58.0±13.5	27.2±2.4	131.2±33.6	4/4
Sour orange	48.6±6.1	41.2±16.2	35.7±17.5	125.5±17.8	8/10
Sunki	32.3±14.5	43.8±12.6	30.2±10.2	106.3±23.2	16/17

[z] Trees planted in 2000, October and those with abnormal appearance were excluded from investigation (mean±SD).

表 8. 古坑 B 試區砧木對茂谷柑果實品質之影響 [z]

Table 8. Effect of different species of rootstocks on fruit quality of 'Murcott' tangor at the Gu-Keng, Yunlin B trial [z]

Rootstock	Fruit weight (gm)	Diameter [y] (mm)		Juice yield (%)	Total soluble solid (^{o}Brix)	Acid content (%)	No. trees (investigated / planted)
		Trans.	Longi.				
Troyer	210.1±6.5	76.7±1.7	59.8±1.5	47.8±0.1	13.6±0.4	0.70±0.02	4/4
Trifoliate	187.0±3.0	74.6±0.5	57.8±0.4	49.7±0.6	13.2±0.3	0.70±0.05	3/3
Sour orange	208.5±14.0	77.3±2.5	60.2±1.5	47.5±2.3	12.6±0.5	0.65±0.02	6/10
Swingle	217.0±10.1	78.1±1.5	60.7±1.3	48.3±1.1	12.2±0.4	0.68±0.04	6/16
Sunki	207.8±11.5	76.7±2.1	59.3±1.4	49.2±1.5	12.0±0.5	0.64±0.05	6/17
Rangpur lime	227.5±24.1	79.4±2.8	61.6±1.9	48.0±1.3	11.7±0.4	0.58±0.01	6/10
Pummelo	240.0±24.6	81.7±2.6	62.4±2.4	45.7±2.0	11.6±0.3	0.62±0.10	3/3
Rough lemon	223.3±19.3	78.4±2.4	61.6±2.0	44.7±1.2	10.8±0.6	0.54±0.03	6/12

[z] Trees planted in 2000, fruit sampled in 2005 (mean±SD).

[y] trans.: transversal; longi.: longitudinal.

本試驗植株之衰弱均與病害有關。雖有報告指出部分 Swingle 枳柚砧之茂谷植株，至十餘年生後穗砧間有親和性的問題，但此可能是多胚性之 Swingle 枳柚實生苗中，少數雜交後代所發生之變異 (Garnsey *et al*. 2001)。本試驗中，該砧木及嘉義分所健康柑橘種原 16 株 12 年生 Swingle 枳柚砧之茂谷植株生長均正常，其穗砧癒合處亦未觀察到典型不親和之凹陷 (creasing) 徵狀。

由多數柑橘砧木試驗結果歸納 (Castle 1987; Hwang 2000; Newcomb 1978; Wutscher 1979)，生長勢強之砧木如粗皮檸檬、廣東檸檬等產量高，果實糖酸含量較低；生長勢弱者如枳殼產量低，果實糖酸含量較高。嘉義試區砧木間產量之差異主要受病害的影響。古坑鄉 A 試區兩年結果數合計，由高至低，五種處理依次為 Swingle 枳柚、廣東檸檬、粗皮檸檬、Troyer 枳橙、雜交柚。古坑鄉 B 試區異常植株不列入統計，由高至低依次為粗皮檸檬、廣東檸檬、枳殼、Swingle 枳柚、雜交柚、Troyer 枳橙、酸橙、酸橘。如考量古坑鄉 A 試區 2 株粗皮檸檬砧發生裾腐病對生育之可能影響，兩試區砧木間產量高低有相似之趨勢，亦與前述一般砧木試驗歸納之結果相同。Figueiredo 等 (2006)

之報告，七年茂谷柑之單株產量，枳殼砧之產量低，酸橘砧者高，本試驗古坑鄉 B 試區三年累計之單株產量，枳殼砧高而酸橘最低與之不同。除調查期限不同外，不同地區土壤性質差異 (Snyman *et al*. 1996) 及氣候均可影響砧木之表現。

砧木對果實品質的影響，在三試區的表現甚相近。果重、縱徑、橫徑、皮厚、果汁率在處理間均無顯著差異。可溶性固形物、含酸量以枳殼及其雜交種 Troyer 枳橙、Swingle 枳柚較高，酸橘及酸橙中等，雜交柚、廣東檸檬及粗皮檸檬最低。此與茂谷柑 (Wheaton *et al*. 1991) 及一般柑橘砧木試驗歸納之結果 (Castle 1987; Newcomb 1978; Wutscher 1979) 相似。但 Figueiredo 等 (2006) 之報告，主要砧木種類對茂谷柑果實品質無顯著影響，這也應與不同地區之氣候、土壤與管理導致個別試驗間之差異有關。

酸橘與廣東檸檬是目前台灣茂谷柑的主要砧木，本研究顯示做爲茂谷柑之砧木，酸橘品質中等，但產量偏低，廣東檸檬產量高，但風味較淡。廣東檸檬、酸橘對疫病、柑橘線蟲均爲罹病，枳殼、Swingle 枳柚對兩者具抗病性 (Ann 1989; Chang 1980; Lin 1989)。本試驗調查顯示 Swingle 枳柚品質、產量均優於廣東檸檬或酸橘，可做爲發生疫病與柑橘線蟲園地更新之砧木，但幼樹期應注意黃龍病媒介昆蟲之防治，並採用無鱗砧病與破葉病之健康接穗。

誌　　謝

本研究承高雄區農業改良場林永鴻先生分析土壤、嘉義分所倪惠芳小姐調查線蟲，謹此致謝。

引用文獻 (Literature cited)

Ann, P. J. 1989. Phytophthora diseases of citrus in Taiwan. p.212-221. *in*:Proceeding of a Symposium on the Researches and Development of Citrus in Taiwan. TARI Special Publication No.27. (in Chinese with English abstract)

Ashkenazi, S. 1992. Growing Murcott in Israel. Rootstocks, quality, yield. Alon Hanotea 46(5):321-329.

Broembsen, L. V. 1984. Citrus rootstocks-the choice you have. Citrus and Subtropical Fruit Journal. Nov. 610:6-12.

Castle, W. S. 1987. Citrus rootstocks. p.361-399. *in*:Rootstocks for Fruit Crops. (Rom, R. C., and R. F. Carlson, eds.) John Wiley and Sons, New York.

Chang, D. C. 1980. The selection and test of citrus rootstocks as host of *Partylenchus coffeae* and *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. J. Chinese Soc. Hortic. Sci. 26 (2,3):71-77. (in Chinese with English abstract)

Cheema, S., S. P. Kapur, and J. S. Chohan. 1982. Evaluation of rough lemon strains and other rootstocks against greening-disease of citrus. Sci. Hortic. 18:71-75.

Ferguson, L., N. Sakarich, and M. Roose. 1990. California citrus rootstocks. Publication 21477, Univ. of Calif., Div. of Agric. and Natural Resources. 18 pp.

Figueiredo, J. O., J. D. Negri, D. Mattos Jr., R. M. Pio, F. A Azevedo, and V. X. P. Garcia. 2006. Behavior of sixteen rootstocks for Murcott in Itirapina, SP, Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura 28(1):76-78.

Garnsey, S. M., W. S. Castle, D. P. H. Tucker, R. E. Rouse, and M. C. Kesinger. 2001. Budunion incompatibilities and associated declines observed in Florida among trees on Swingle citrumelo and other trifoliate orange-related rootstocks. Proc. Fla. State Hortic. Soc.114:121-127.

Huang, C. H., and C. F. Liaw. 1995. A proposed strategy for control of citrus likubin from ecological viewpoint in Taiwan. p.177-186. *in*:the Proceeding of Symposium on the Research and Development of Citrus in Taiwan. TARI Special Publication No.51. (in Chinese with English abstract)

Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. J. Phytopathol. 147:599-604.

Hwang, A. S. 2000. Characteristics of citrus rootstocks and its choice in citriculture. J. Chinese Soc. Hortic. Sci. 46(2):133-146. (in Chinese with English abstract)

Lange, J. D., A. P. Vincent, and M. Nel. 1985. Breeding for resistance to greening disease in citrus. Citrus and Subtropical Fruit Journal 614:6-9.

Lin, Y. Y. 1989. The problem of citrus nematode. p.33-42. *in*:the Proceeding of Symposium of Plant Nematode Disease Control. TARI Special Publication No.27. (in Chinese)

Newcomb, D. A. 1978. Selection of rootstocks for salinity and disease resistance. Proc. Int. Soc. Citricuture 117-120.

Shieh, C. F. 1990. Physiological disorders of fruit trees in central Taiwan. p.103-118. *in*:the Proceeding of Symposium on Fruit Tree Nutrition and Orchard Soil Management. (Chang, L. R. ed.) Special Publication No. 20, Taichung District Agriculture Improvement Station. (in Chinese with English abstract)

Snyman, J. C., H. J. breedt, J. J. Koekemoer, and J. E. Miller. 1996. Evaluation of rootstocks for Valencia in South Africa. Proc. Int. Soc. Citriculture 268-270.

Wheaton, T. A., W. S. Castle, J. D. Whitney, and D. P. H. Tucker. 1991. Performance of citrus scion cultivars and rootstocks in a high-density planting. HortScience 26(7):837-840.

Wutscher, H. K. 1979. Citrus rootstocks. p.230-269. *in*:Horticultural Reviews. (Janick, J. ed.) AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.

Effects of Rootstocks on Tree Growth, Yield and Fruit Quality of 'Murcott' Tangor[1]

A-Shiarn Hwang[2,4] and Shih-Cheng Hung[3]

Abstract

Hwang, A. S., and S. C. Hung. 2007. Effects of rootstocks on tree growth, yield and fruit quality of 'Murcott' Tangor. J. Taiwan Agric. Res. 56:298-306.

In order to evaluated the effects of different species of rootstocks on fruit production of 'Murcott' tangor. Scions of 'Murcott' tangor were grafted on one year old seedlings of eight species of rootstocks and planted in the Chia-Yi Agricultural Experiment Station and two sites at Gu-Keng, Yunlin County. Tree growth, yield and fruit quality were investigated at the sixth and seventh year after transplanting. Accumulated yields of healthy plants were high on rough lemon and 'Rangpur' lime, intermediate on trifoliate, 'Swingle' citrumelo and 'Troyer' citrange, low on sour orange and Sunki. The fruit qualities were similar among most combination of the 'Murcott' tangor and rootstocks species. Total soluble solids and acid contents were high from 'Murcott' tangor grafted on trifoliate, 'Swingle' citrumelo and 'Troyer' citrange, intermediate on Sunki and sour orange, and low on 'Rangpur' lime and rough lemon. In Chia-Yi Agricultural Experiment Station low yield of 'Murcott' tangor on 'Swingle' was resulted from infection with Huanglongbing, whereas low yield on Sunki and 'Troyer' citrange was due to *Phytophthora* foot or root rot.

Key words: Murcott, Citrus rootstock, Tree growth, Yield, Fruit quality.

1. Contribution No.2303 from Agricultural Research Institute , Council of Agriculture. Accepted: December 10, 2007.
2. Associate Horticulturist, Department of Horticulture, Chia-Yi Agricultural Experiment Station, ARI, Chia-Yi, Taiwan.
3. Assistant Entomologist, Department of Plant Protection, Chia-Yi Agricultural Experiment Station, ARI, Chia-Yi, Taiwan.
4. Corresponding author, e-mail:hwangas@dns.caes.gov.tw; Fax:(05)2773630.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):307-315 (2007)

台灣甜瓜白粉病菌*Podosphaera xanthii*的生理小種[1]

黃晉興[2,4] 王毓華[3]

摘 要

黃晉興、王毓華。2007。台灣甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 的生理小種。台灣農業研究 56:307-315。

利用甜瓜白粉病菌分生孢子單孢培養於盛有葉圓片的培養皿內，以純化培養自各地蒐集的菌株。從 2001-2004 年自台中霧峰、雲林崙背、台南市及桃園八德等地罹患白粉病 '金輝'、'蜜世界'、'香華' 的甜瓜葉片，及呈現抗病反應的 '台農 10 號' 葉片上的稀疏病斑，所分離蒐集的菌株均為 *Podosphaera xanthii* 生理小種 1 (race 1)；2005 年春季，從感病的 '台農 10 號' 分離出 *P. xanthii* 生理小種 5 (race 5)，同時栽培的感病 '香華' 品種所分離的菌株則生理小種 1 及 5 均有，而同年春季於台南亦可分離得生理小種 1 及 5。將此 2 個生理小種分別接種於 '香華' 及 '台農 10 號' 葉圓片上，'香華' 品種對 *P. xanthii* 生理小種 1 及 5 皆感病，而 '台農 10 號' 品種則呈現抗 *P. xanthii* 生理小種 1，但對生理小種 5 感病。從 181 個分離株中，屬於生理小種 1 者有 138 個；而屬於生理小種 5 者有 43 個，顯示甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 至少有 2 種生理小種存在於台灣，其中以生理小種 1 較普遍。

關鍵詞：甜瓜、白粉病、生理小種。

前 言

白粉病是甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 主要的真菌病害之一，主要由 *Podosphaera xanthii* (Castag.) Braun & Shish (syn. *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll; *S. fusca* (Fr.) Blumer emend. Braun) 及 *Golovinomyces cichoracearum* (D. C.) Huleta (syn. *Erysiphe cichoracearum* DC ex. Mecat) 所引起 (Braun *et al.* 2001; Jahn *et al.* 2002)，在台灣僅有 *P. xanthii* 被鑑定為甜瓜白粉病之病原菌 (Huang *et al.* 2002; Tsay & Tung 1994)。

雖然甜瓜、胡瓜、南瓜之抗白粉病品種已被廣泛栽培，但瓜類作物白粉病菌之生理小種研究卻僅侷限於在甜瓜白粉病上，且以法國發表的生理小種系統被國際廣泛接受，利用鑑別品種 IRAN-H, Vedrantais, PMR 45, WMR 29, Edisto 47, PI 414723, PMR 5, PI 124112 (or MR-1) 可鑑定出 *P. xanthii* 有 0、1、2-USA、2-Europe、3、4、5 等 7 個生理小種，而 *G. cichoracearum* 有 1、2 等 2 個生理小種 (Pitrat *et al.* 1998)。在法國、美國、以色列、日本、蘇丹等地皆有甜瓜白粉病菌生理小種的報告 (Alvarez *et al.* 2000; Cohen *et al.* 1996; Hosoya *et al.* 1999; Zitter *et al.* 1996)，而最近有學者由多篇報告所累積而得的資料推測甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 可能有 28 個生理小種 (McCreight *et al.* 2006)。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2304 號。接受日期：96 年 12 月 14 日。
2. 本所植物病理組助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所作物組助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：jhhuang@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23321508。

農業試驗所近年所育成之‘台農 10 號’甜瓜品種對 *P. xanthii* 有高度抗性 (Wang *et al.* 2005)，但 2005 年春作出現罹病植株，為了要了解其中的差異，我們利用田間栽培及葉圓片接種法測定甜瓜對白粉病的抗感病反應，來判別是否有不同的生理小種出現，及‘台農 10 號’甜瓜對白粉病不同生理小種的抗感性。

材料與方法

供試作物之栽培及葉圓片製備

將各品種甜瓜之種子置於盛有潮濕濾紙之玻璃培養皿中催芽，待發芽後種植於盛有泥炭土 (Bio-mix) 之五吋塑膠盆中，於 28℃ / 22℃ (Day / night) 光照 12 小時之生長箱中栽培 4-6 週，甜瓜植株長有 4-8 片完全展開葉，取植株之中上位展開葉以自來水洗淨，再經消毒水 (1%次氯酸鈉，並於 200 mL 消毒水加入數滴 Tween-20 界面活性劑攪拌) 表面消毒 1 分鐘，無菌水漂洗三次，吸乾游離水，再以經高溫滅菌後之金屬圓柱器具切取直徑 1.5 cm 葉片圓片，正面朝上，置於盛有二層濾紙之塑膠培養皿內(直徑 9 cm)，添加適量含有 50 ppm tetracyclin 之 M-solution（mannitol 10,000 ppm 及 benzimidazole 30 ppm 之水溶液）使濾紙完全濕潤並有游離水產生，以維持葉片圓片之活力及避免細菌污染影響試驗結果 (Epinet *et al*. 1993; Huang *et al*. 2002)。

白粉病菌蒐集、分離、培養、保存及接種

2001-2005 年自台中縣霧峰鄉試驗田、2003 年於雲林縣崙背鄉試驗田、2004 年於台南市農田及桃園縣八德市試驗田，及 2005 年於台南縣新化鎮與七股鄉等地，各處選取 1-2 處農田，每處農田取樣 2-5 片出現白粉病病斑之甜瓜葉片，於解剖顯微鏡下以單根毛髮為工具，挑取單一孢子沾黏於上述製備妥的葉圓片上（IRAN-H 品種），個別培養於盛有葉圓片的無菌培養皿內，一個培養皿內就僅繁殖一個甜瓜白粉病菌分離株，進行單孢培養，以此方式確保純化菌株 (Nicot *et al.* 2002)，每個葉片至少挑取 2 個菌株，於 24/18℃（日夜溫）光照 12 小時的條件下培養 12-14 天，即有大量分生孢子可供接種，而長有白粉病菌之葉圓片於 16℃定溫箱自然乾燥 4 天後，密封於 2.5 mL 之玻璃安瓶中，於-25℃之冷凍櫃或液態氮容器內保存。

於塑膠圓椎管（底管口直徑 12 cm，上管口直徑 4 cm，高 30 cm）上管口，以加壓氣流將生長於葉圓片之各白粉病菌菌株分生孢子，吹落於置於圓椎管內之葉片圓片 (Huang *et al.* 2002)，孢子濃度 50-100 spore/cm2，容器加蓋密封置於 24℃/18℃ (Day / night) 光照 12 小時之定溫箱中，培養 10 天後記錄發病指數 (Huang *et al.* 2002)。發病指數分為 0-9 共 10 級 (Mohamed *et al.* 1995; Huang *et al.* 2002)：0 級-無病斑；1 級－病斑佔葉面積 10%；3 級－病斑佔葉面積 50%；5 級－病斑佔葉面積 80%；7 級－病斑佔葉面積 100%但孢子量稀薄；9 級－病斑佔葉面積 100%而孢子量厚實且葉片圓片褐化，未詳述之級數依病害嚴重程度斟酌訂定。

P. xanthii 之形態與生理小種之鑑定

各個甜瓜白粉病菌菌株培養於葉圓片上，於顯微鏡下直接觀察，或將分生孢子刮落散佈於水瓊脂培養基上，於 24℃培養 24 小時後（光照 12 小時），觀察白粉病菌生長及發芽管之形態特性，鑑定各白粉病菌菌株之種類。而生理小種之測定，則利用上述葉圓片接種法將每個純化培養之菌株，將分生孢子接種於盛有 8 種甜瓜鑑別品種葉圓片之培養皿內，每個鑑別品種 2 個葉圓片，鑑別品種分別為 1：Iran-H、2：Vedrantais、3：PMR-45、4：PMR-5、5：Edisto-47、6：PI-414723、7：MR-1 及 8：WMR-29，(圖 1)，於 24℃/18℃（日／夜溫）光照 12 小時之定溫箱中，培養 10 天後記錄發

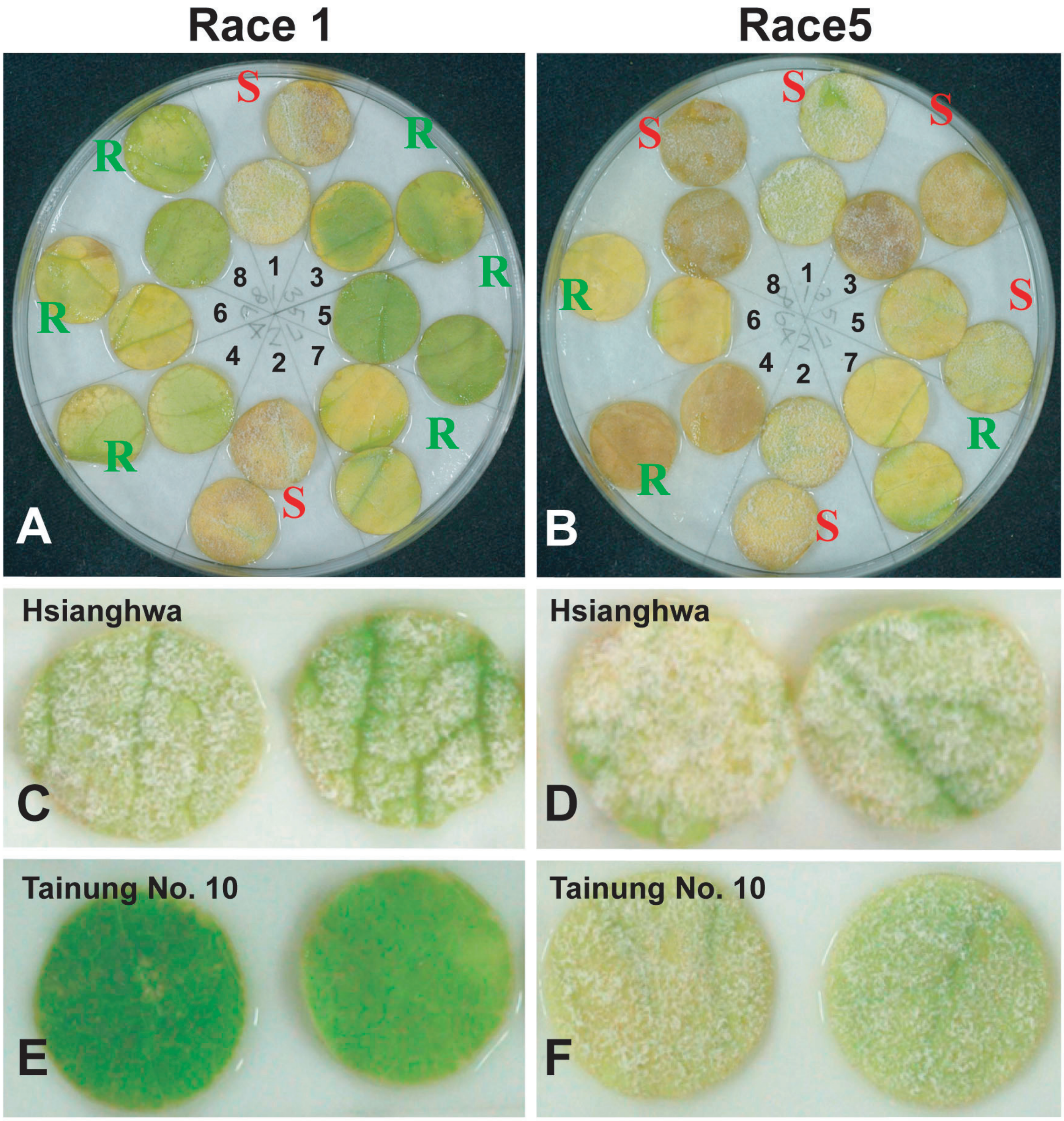


圖 1. 甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 生理小種 1（左欄）及 5（右欄）對 8 種鑑別品種 (A、B) 及試驗品種‘香華’(C、E) 、‘台農 10 號’(D、F) 之致病力反應。鑑別品種分別爲 1:Iran-H, 2:Vedrantais, 3:PMR-45, 4:PMR-5, 5:Edisto-47, 6:PI-414723, 7:MR-1 and 8:WMR-29，R 表示抗病，S 表示感病。

Fig. 1. The susceptible response of different varieties inoculated with *Podosphaera xanthii* race 1 (left column) and race 5 (right column). The differential varieties (A, B) were 1:Iran-H, 2:Vedrantais, 3:PMR-45, 4:PMR-5, 5:Edisto-47, 6:PI-414723, 7:MR-1 and 8:WMR-29, and other test varieties were Hsianhwa (C, E) and Tainung No. 10 (D, F). R:resistant, S:susceptible.

病指數，平均發病指數 3 或以上者，視爲感病，否則視爲抗病 (Mohamed *et al.* 1995; Pitrat *et al.* 1998)。生理小種 1 (race 1) 僅感染甜瓜鑑別品種 1 及 2，而生理小種 5 (race 5) 則可感染鑑別品種 1、2、3、5、8（圖 1）。

甜瓜台農 10 號對 *P. xanthii* 不同生理小種之抗感病反應

將前述自試驗田分離、單孢純化且經生理小種鑑別之 *P. xanthii* 生理小種 1、5 菌株（菌株編號 Px-001 及 Px-086，農試所植病系蔬菜花卉病害研究室）做爲供試菌，'台農 10 號' 甜瓜及對照商業品種 '香華'（Hsianhwa，農友種苗公司，台灣）以前述方法種植於生長箱中，取葉片製備成葉圓片盛於培養皿內，依前述葉圓片接種法測定此 2 個甜瓜品種對不同 *P. xanthii* 生理小種之抗感病反應。

甜瓜台農 10 號抗白粉病之田間表現

2004 年春季於桃園縣八德市試驗田、2004 年秋季及 2005 年春季於台中縣霧峰鄉試驗田，檢測 '台農 10 號' 甜瓜對白粉病的抗感病反應，栽培時採區集完全逢機設計 (RCRD)，以商業品種 '香華' 爲感病的對照品種，每個品種 4 重複，每個重複 10-20 株，於採收前 2 週調查白粉病發病度。調查時，每個重複選取 10 株，每株均勻選取 10 葉記錄白粉病斑所佔葉面積的比率 (%)，取平均數視爲該株、該重複或該品種之發病度 (%)。

結　果

白粉病菌菌株蒐集、種類及生理小種之鑑定

自 2001 到 2005 年所蒐集的甜瓜白粉病菌，經由單孢純化後共獲得 181 個菌株（表 1），在葉圓片上，所有菌株形成之分生孢子均爲串生、橢圓形、大小 20-32.2 µm × 17.0-19.5 µm，孢子串外緣鋸齒狀 (crenate)、分生孢子內容物有明顯針或柱狀的皿狀物、發芽管常自孢子側邊長出且易分叉，由以上的特徵鑑定爲 *Podosphaera xanthii* (Boesewinkel 1980; Broun *et al.* 2002; Huang *et al.* 2002; Tsay & Tung 1994; Zaracovitis 1965)。將各菌株接種於 8 種鑑別品種的葉圓片上，發現 2001-2003

表 1. 從 2001 至 2005 年於台灣各地不同甜瓜品種白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 之生理小種

Table 1. The races of *Podosphaera xanthii* isolated from various varieties and seasonal location in Taiwan from 2001-2005

Time	Area	Variety	Tatal isolates	Race 1	Race 5	Disease severity (%) [z]	Susceptible reaction [y]
2001-2003	Wufeng	Golden Light	28	28	0	ND	S
		Hsianhwa	10	10	0	ND	S
Winter, 2003	Lunbei	Hsianhwa	10	10	0	ND	S
	Tainan	Honey world	10	10	0	ND	S
Spring, 2004	Bade	Tainung No. 10	15	15	0	3.3	R
		Hsianhwa	10	10	0	66.7	S
Autumn, 2004	Wufeng	Tainung No. 10	5	5	0	0.4	R
		Hsianhwa	10	10	0	63.3	S
Spring, 2005	Wufeng	Tainung No. 10	10	0	10	48.0	S
		Hsianhwa	28	19	9	83.3	S
	Hsinhwa	IRAN-H	10	10	0	ND	S
		PMR-45	10	0	10	ND	S
	Chiku	Hsiufen, Chuanyuan	25	11	14	ND	S

[z] ND:Non-detected.

[y] R:resistant, S:susceptible.

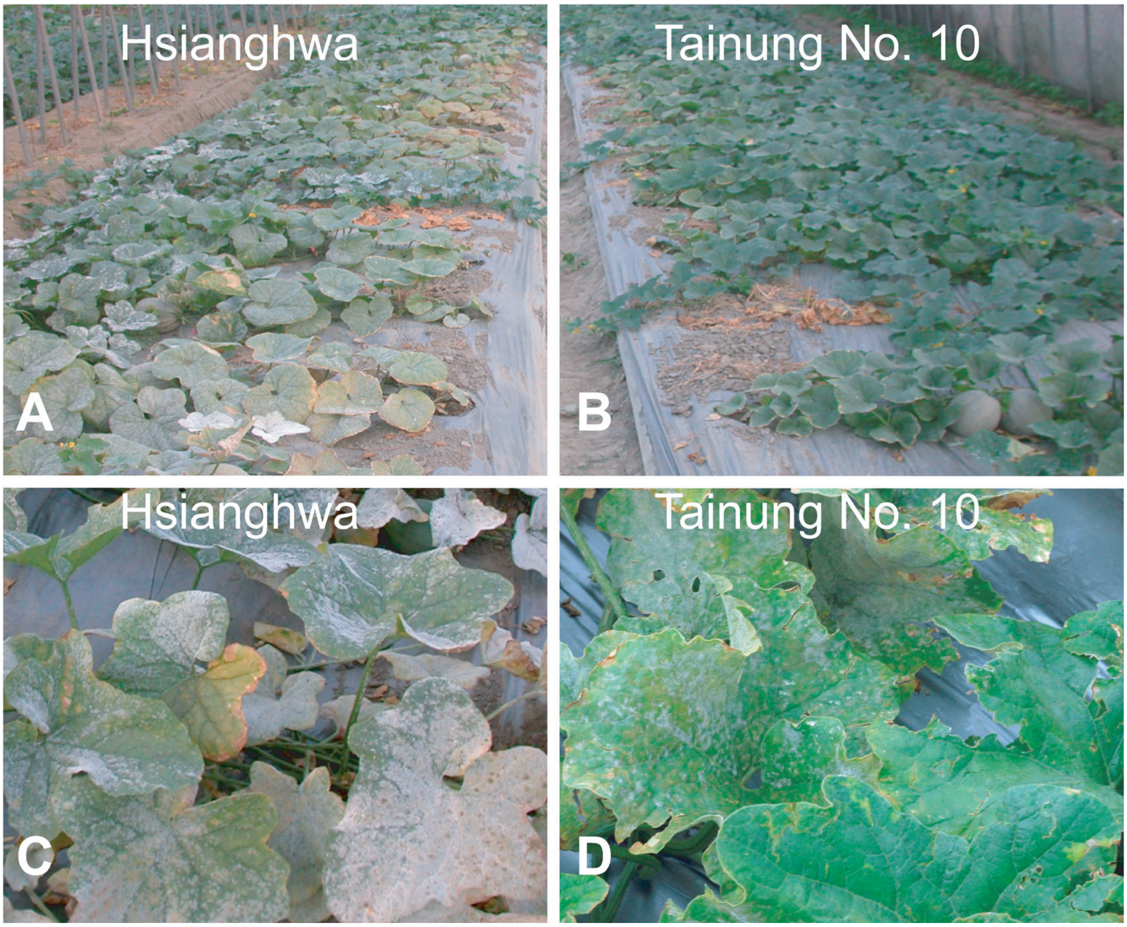


圖 2. 田間栽培甜瓜‘香華’品種（左欄）及‘台農 10 號’品種（右欄）對白粉病的抗感性比較。‘香華’於 2004 秋作 (A) 及 2005 年春作 (C) 均表現出相同的感病性，而‘台農 10 號’於 2004 秋作 (B) 表現抗病但 2005 年春作 (D) 表現感病的反應。

Fig. 2. Susceptible reaction of melon varieties against powdery mildew in the field. Hsianhwa showed susceptible response when planted in the field in autumn, 2004 (A), and spring, 2005 (C). Tainung No. 10 are resistant in autumn, 2004 (B) but susceptible in spring, 2005 (D).

分離之 58 個菌株（表 1），均為生理小種 1，它們可以感染 Iran-H 及 Vedrantais （圖 1 A），包括於台中縣霧峰鄉自‘金輝’品種甜瓜 (Golden Light) 分離得 28 個菌株及自‘香華’品種分離得 10 個菌株，於雲林縣崙背鄉從‘香華’品種及於台南市從‘蜜世界’品種 (Honey world) 各分離 10 個菌株；2004 年春季於桃園縣八德市及冬季於霧峰鄉，無論從抗病反應‘台農 10 號’的病斑或由感病的‘香華’所分離得到的菌株皆為生理小種 1。然而 2005 年春季，栽培於台中縣霧峰鄉而染病的‘台農 10 號’病斑分離 10 個菌株均屬於生理小種 5，它們可以感染 Iran-H、Vedrantais、PMR-45、Edisto-47、WMR-29；而由染病的‘香華’分離得 28 個菌株中，有 19 個為生理小種 1，另 9 個為生理小種 5；此外，亦於台南縣新化鎮從染病的 IRAN-H 品種與染病的 PMR-45 品種（抗 *P. xanthii* race 0, 1）各分離 10 個菌株分別為生理小種 1 或 5，及於七股鄉從‘淑芬’品種 (Hsiufen) 與‘狀元’品種 (Chuanyuan) 共分離 25 個菌株中，其中 11 株為生理小種 1，14 株為生理小種 5（表 1）。

甜瓜台農 10 號對 *P. xanthii* 不同生理小種之抗感病反應

由圖 1 及表 1 結果顯示，商業品種‘香華’對 *P. xanthii* 生理小種 1 及 5 皆感病，而‘台農 10 號’品種則抗 *P. xanthii* 生理小種 1 而感生理小種 5，但葉圓片上生理小種 5 的孢子堆密度較‘香華’品種低（圖 1 F、E）。

甜瓜台農 10 號抗白粉病之田間表現

2004 年春季於桃園縣八德市及冬季於霧峰鄉，對照品種‘香華’發病嚴重（發病度 63.3-66.7%），屬於感病性（表 1、圖 2 A），而‘台農 10 號’則屬抗病性，僅有 27.8-38.9 %的植株受到白粉病的輕微感染（發病度 0.4-3.3%）（表 1、圖 2 B），此時試驗田出現的菌株皆為 *P. xanthii* 生理小種 1（表 1）；然而 2005 年春季於霧峰鄉試驗田的‘香華’及‘台農 10 號’品種所有植株皆受白粉病感染，均呈現感病反應，發病度分別為 83.3%及 48%，但‘台農 10 號’葉片上的病徵較‘香華’品種輕微（圖 2D、C），此時試驗田出現的菌株為 *P. xanthii* 生理小種 1、5 均有（表 1）。

討 論

一般認為抗病品種是防治甜瓜白粉病最方便有效的方法，但過去台灣的抗甜瓜白粉病育種工作一直不順利，主要原因是光靠田間自然感染而沒有良好的接種方法，且未有甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 生理小種的報告，故我們利用葉圓片接種法來加強甜瓜抗感病性的測定，並由法國 INRA 機構所提供的甜瓜鑑別品種，將各品種葉圓片同時置於一個培養皿內（圖 1），將自田間蒐集、單孢純化的菌株接種於其上，由各鑑別品種抗感病反應的差異，以判別所測試的菌株是否屬於不同生理小種。

從 2001-2004 年所分離蒐集的菌株經由鑑定檢測均為 *Podosphaera xanthii* 生理小種 1 (race 1)，這段期間於桃園八德、台中霧峰等地栽培‘台農 10 號’則發病輕微，均屬抗病的反應，然而 2005 年春季，‘台農 10 號’卻發病嚴重，從其葉片上所分離的菌株經由鑑定檢測並非生理小種 1，而為新浮現之 *P. xanthii* 生理小種 5 (race 5)，而同時栽培的‘香華’品種所分離的菌株則生理小種 1 及 5 均有；同年春季於台南亦可分離得生理小種 1 及 5（表 1）。將此 2 個生理小種分別接種於‘香華’及‘台農 10 號’，‘香華’品種對 *P. xanthii* 生理小種 1 及 5 呈感病反應，而‘台農 10 號’品種仍對 *P. xanthii* 生理小種 1 呈抗抗病反應，但對生理小種 5 呈感病反應，不過在葉圓片接種法的測定結果中，‘台農 10 號’感染生理小種 5 的病害級數為 7，遠較‘香華’級數 9 輕微（數據未呈現），在田間發病也較輕（表 1、圖 2D）。

由上述的結果顯示，台灣甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 有生理小種 1 及 5 的存在，然而 2001 至 2004 年均未蒐集得生理小種 5，可能原因有：菌株蒐集的時間、地點不夠多；病原菌突變；國外採種引進。其中病原菌突變造成生理小種 5 的出現我們認為不可能，因為在台南未種植‘台農 10 號’也可分離得到生理小種 5。

國外的報告指出，甜瓜白粉病菌不同的生理小種可能同時同地出現，亦可能不同時期或不同地點發生 (Cohen 1993; Hosoya *et al.* 1999; Mohamed *et al.* 1995; Sowell 1982)，故抗病育種工作若僅於田間進行常只篩選到當時、當地出現的生理小種。我們推測台灣甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 可能有數個生理小種，因氣候的變化或地理條件而使某些生理小種繁殖傳播較易，但生理小種 1 最易蒐集得到，故該菌應為台灣甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 的最常見的生理小種。

蒐集白粉病菌方法很多，在台灣，冬季乾冷的季節於田間或溫室的甜瓜皆可容易獲得白粉病菌，可直接帶回感病葉片或用滅菌器具去取下分生孢子，但易雜其它微生物，故需要進一步純化培

養，可利用單一菌落繁殖 (single-colony culture) (McDermott *et al.* 1994; Huang *et al.* 1995)，但需要連續數次的操作，才能確保其單純度；爲了避免困擾可採用單孢培養 (single-spore culture) (Nicot *et al.* 2002) 或單一分生孢子串培養 (single-conidial-chain culture) (Evans *et al.* 1996)，個別培養於盛有葉圓片的無菌培養皿內 (Huang *et al.* 2002; Nicot *et al.* 2002)，一個培養皿內僅繁殖一個甜瓜白粉病菌分離株，避免摻雜其他菌株，達到菌株純化培養的目的。

引用文獻

Alvarez, J. M., M. L. Gomez-Guillamon, N. A. Tores, I. Canovas, and E. Floris. 2000. Virulence differences between two Spanish isolates of *Sphaerotheca fuliginea* race 2 on melon. Acta Hortic. 510:67-69.

Boesewinkel, H. J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). Bot. Rev. 46:167-224.

Braun, U., R. T. A Cook, A. J. Inman, and H. D. Shin. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. p.13-55. *in*: The Powdery Mildews- A Comprehensive Treatise. (Belanger, R. R. *et al*. ed.) APS Press.

Braun, U., N. Shishkoff, and S. Takamatsu. 2001. Phylogeny of *Podosphaera* sect. *Sphaerotheca subsect. Magnicellulatae* (*Sphaerotheca fuliginea s. lat.*) inferred form rDNA ITS sequences- a taxonomic interpretation. Schlechtendalia 7:45-52.

Cohen, R. 1993. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Plant Dis. 77:513-517.

Cohen, R., N. Katzir, S. Schreiber, R. Greenberg, and O. Yarden. 1996. Occurrence of *Sphaerotheca fuliginea* race 3 on cucurbits in Israel. Plant Dis. 80:344. (abstract)

Epinet, C., M. Pitrat, and F. Bertrand. 1993. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildew. Euphytica 65:135-144.

Evans, K. J., D. L. Whisson, and E. S. Scott. 1996. An experimental system for characterizing isolates of *Uncinula necator.* Mycol. Res. 100:675-680.

Hosoya, K, K. Narisawa, M. Pitrat, and H. Ezura. 1999. Race identivication in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo* L.) in Japan. Plant Breed. 118:259-262.

Huang, J. H., Y. H. Wang, and C. T. Lo. 2002. Development of leaf-disk method for screening melon varieties resistant to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. J. Agric. Res. China 51:49-56. (in Chinese with English abstract)

Huang, J., J. Kranz, and H. G. Welz. 1995. Selection of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in pure culture and mixed stands of spring barley. Plant Pathol. 43:458-470.

Jahn, M., H. M. Nunger, and J. D. McCreight. 2002. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. p.239-248. *in*: The Powdery Mildews- A Comprehensive Treatise. (Belanger, R. R. *et al.* ed.) APS Press.

McCreight, J. D. 2006. Melon-powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* race 1 and 2. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 131:59-65.

McDermott, J. Ml., U. Grandle, F. Dutly, U. A. Haemmerli, S. Keller, K. E. Muller, and M. S. Wolfe. 1994. Genetic variation in powdery mildew of barley:Development of RAPD, SCAR, and VNTR markers. Phytopathology 84:1316-1321.

Mohamed, Y. F., M. Bardin, P. C. Nicot, and M. pitrat. 1995. Causal agents of powdery mildew of cucurbit in Sudan. Plant Dis. 79:634-636.

Nicot, P. C, M. Bardin, and A. J. Dik. 2002. Basic Methods for Epidemiological Studies of Powdery Mildews:culture and Preservation of Isolations, Production and Delivery of Inoculum, and Diseaese Assessment. p.83-99. *in*: The Powdery Mildews-A Comprehensive Treatise. (Belanger, R. R. *et al*. ed.) APS Press.

Pitrat, M., C. Dogimont, and M. Bardin. 1998. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. Cucurbitaceae 98:167-173.

Sowell, G. Jr. 1982. Population shift of *Sphaerotheca fuliginea* on muskmelon from race 2 to race 1 in the southeastern United States. Plant Dis. 66:130-131.

Boesewinkel, H. J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). Bot. Rev. 46:167-224.

Tsay, J. G., and B. K. Tung. 1994. Powdery mildew of cucurbit crops. p.127-144. *in*: the Proceeding of Symposium on Techniques of Cucurbits Protection. Plant Protection Society of ROC Press. Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Wang, Y. H., S. T. Wang, T. K. Lin, C. H. Hsiao, and J. H. Huang. 2005. Breeding of muskmelon hybrid variety Tainung No. 10. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 51:428-429. (in chinese)

Zaracovitis, C. 1965. Attempts to identify powdery mildew fungi by conidial characters. Trans. Br. Mycol. Soc. 48:553-558.

Zitter, T. A., D. L. Hopkins, and C. E. Thomas. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases. APS. USA. 87 pp.

The Races of *Podosphaera xanthii* Causing Melon Powdery Mildew in Taiwan [1]

Jin-Hsing Huang[2,4] and Yu-Hwa Wang[3]

Abstract

Huang, J. H., and Y. H. Wang. 2007. The races of *Podosphaera xanthii* causing melon powdery mildew in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 56:307-315.

The single-conidium culture method was utilized for the purification of powdery mildew isolates collected from melons. The race identification was conducted by the leaf-disc inoculation on 8 differential melon varieties. From 2001 to 2004, *Podosphaera xanthii* race 1 was isolated from Wufeng, Lunbei, Tainan, and Bade. The hosts included sensitive cultivars of ‘Golden light’, ‘Honey world’, and ‘Hsianghwa’, and the resistant cultivar ‘Tainung No. 10’. In spring 2005, *P. xanthii* race 5 was isolated from cultivar Tainung No. 10, and races 1and 5 from the cultivar Hsianghwa. At the same time, both races were isolated from Tainan. When these 2 races were inoculated on leaf discs of Hsianghwa and Tainung No. 10, Hsianghwa showed sensitive reaction to these 2 races; nevertheless, Tainung No. 10 was resistant to race 1 but sensitive to race 5. Among 181 isolates obtained, there were 138 isolates were race 1 and only 43 isolates were race 5. The results showed that there were at least 2 races of *P. xanthii* on melon in Taiwan, and race 1 was the predominant race.

Key words: Melon, Powdery mildew, *Podosphaera xanthii*, Race.

---

1. Contribution No.2304 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 14, 2007.
2. Assistant Researcher, Plant Pathology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.
3. Assistant Researcher, Crop Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.
4. Corresponding author, e-mail:jhhuang@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23338162.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):316-326 (2007)

不同栽培基質與覆土材料對雞腿蘑出菇特性之影響[1]

陳錦桐[2,3] 李瑋崧[2] 吳寬澤[2]

摘 要

陳錦桐、李瑋崧、吳寬澤。2007。不同栽培基質與覆土材料對雞腿蘑出菇特性之影響。台灣農業研究 56:316-326。

評估以 20%雞糞稻草堆肥與木屑營養基質（乾重比 35%大麥粉，15%米糠與 50%鋸木屑）二種基質栽培雞腿蘑對其產量與出菇特性之影響，發現此菇 CC1 菌株以木屑營養基質栽培，生物學效率與出菇產量較 CC2 菌株高，達顯著性差異。然而，CC2 菌株以稻草堆肥栽培，其生物學效率與產量較 CC1 菌株高，達顯著性差異。比較泥炭土與田土二種覆土材料對出菇特性與產量之影響，結果以泥碳土覆土，對出菇所需時間較田土短且產量較高，達顯著性差異。比較四種覆土厚度對於出菇特性之影響，發現不論以稻草堆肥或木屑營養基質栽培，不覆土皆無法產生子實體，而覆土厚度以 3.0 cm 對產量表現最佳。以塑膠袋栽與瓶栽二種方式栽培，發現袋栽生物與產菇效率，均優於瓶栽且達顯著性差異。

關鍵詞：雞腿蘑、堆肥、木屑、覆土、出菇。

前 言

雞腿蘑 [*Coprinus comatus* (Müell. ex Fr.) S. F. Gray] 又名毛頭鬼傘 (Huang 1993)、毛鬼傘、刺蘑菇，屬於傘菌目 (Agaricales)，傘菌科，鬼傘屬，原是腐生性可食性真菌，子實體單生或叢生，傘蓋直徑 3-5 cm，高約 9-11 cm，菇體棒槌狀，蕈傘呈鐘形，表面褐色或淺褐色，並隨著傘蓋長大而斷裂成較大鱗片，表面開傘後邊緣菌褶溶化成墨汁狀液體，菌肉白色，菌柄較細長，圓柱形且基部較粗，長 7-25 cm，粗 1-2 cm，內部鬆軟或空心，菌環白色脆薄易脫落，孢子黑色，光滑，橢圓形 (Fang *et al.* 2003)。雞腿蘑在台灣被稱雞腿菇為近年來新興的食用菇蕈，是一種適應性很強的土生菌、草腐菌或糞生菌 (Fang *et al.* 2003)。主要分布地區為中國大陸 (Fang *et al.* 2003)、南非 (Bottomley & Talbot 1953)、德國與美國 (Marek *et al.* 2001) 等地。雞腿蘑味道鮮美，肉質細嫩，營養豐富，除高蛋白低脂肪低熱能 (Winterboer & Eicker 1983) 外，含有 20 種氨基酸，其中 8 種為人體必須之氨基酸 (Bao 1998)，此外，經動物試驗發現餵食雞腿蘑子實體，具有明顯降低血糖濃度效果 (Guo *et al.* 1998)，及使小鼠體重不再增加之功效 (Bailey *et al.* 1984)。雞腿蘑的熱水提取物對小白鼠肉瘤 S-180 及艾氏癌抑制率分別達到 100%和 90% (Ying *et al.* 1987)。

雞腿蘑菌絲體生長的最適溫度範圍為 24-29℃，菌絲生長溫度最高為 38℃，最低為 6℃ (Xu *et al.* 1998)，菌絲抗寒能力相當強，在-30℃條件下仍然可越冬存活 (Fang *et al.* 2003)。菌絲體最適

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2305 號。接受日期：96 年 12 月 17 日。
2. 本所植物病理組助理研究員、助理研究員、副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：jtchen@wufeng.tari.gov.tw；傳真：(04)23338162。

pH 値爲 6-8 (Bao *et al.* 1998)。培養料含水量在 60-70%對於菌絲體生長較好也較快，菌絲較爲濃密、潔白、均勻；尤其含水量在 62.5%時爲最佳生長之基質含水量，低於 50%或高於 75%皆不利於菌絲體生長 (Guo *et al*. 1998)。雞腿蘑子實體生長最適溫度爲 15-24℃，溫度超過 20℃ 以上時，菌柄易伸長，菌蓋變薄，品質降低，極易開傘自溶 (Liu *et al.* 2001)。中國大陸是主要雞腿蘑發源地與栽培國 (Huang 1993)，所用的栽培介質以棉子殼、玉米秸等爲主料及採用畦床模式栽培 (Wang *et al.* 2001; Wang & Min 2002)。台灣近年來新興菇類蓬勃發展 (Ho & Peng 2006)，雞腿蘑爲其中一種，大都自中國大陸引入，但是中國大陸的栽培模式與栽培原料不同於台灣，不適用於台灣栽培生產，因此，本文主要探討在台灣栽培雞腿蘑適合之材料、栽培基質與覆土材料，及覆土厚度對於雞腿蘑出菇之影響，希望有助於台灣對此菇之栽培生產。

材料與方法

供試菌系

本研究用的雞腿蘑 [*Coprinus comatus* (Müell. ex Fr.) S. F. Gray] 菌株CC1與CC2爲農試所菇類研究室自埔里與草屯農戶栽培場所分離蒐集，以洋菇堆肥培養基與馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA; Difco) 作定期更新培養。

溫度對雞腿蘑菌絲生長之影響

將雞腿蘑 CC1 與 CC2 菌株以 PDA 平板培養在 24℃，14 天後，以內徑 0.7 cm 的打孔器，切取菌絲塊，再移至 PDA 平板，置於 4℃、8℃、12℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃與 36℃等 9 種溫度定溫箱，每種溫度 4 個平板重複，培養期間不照光，7 天後調查菌絲生長的情形。試驗重複二次。

麥粒菌種與木屑菌種的製備

小麥以水洗淨，置於冷水中加熱煮沸，經沸騰 20 min 後，濾除水分，並添加 1%的碳酸鈣，冷卻後裝入四角瓶（約 50 g 麥粒）內且瓶口塞好矽膠塞，置於高溫高壓蒸氣殺菌 (121℃, 1.2 kg/cm^2, 1 hr)，隔夜冷卻後再將上述供試菌株接種於四角瓶中，置於 24℃培養 20 天，培養期間不照光，菌絲長滿後，即得麥粒菌種。將雜木鋸木屑混合米糠，體積比爲 10：1，調整混合基質含水量爲 65%左右，裝入四角瓶中，經高溫高壓蒸氣殺菌，隔夜冷卻後，接種上述長滿 PDA 斜面培養基之雞腿蘑菌絲塊，置於 24℃培養 25 天，至菌絲長滿瓶內基質爲止，菌絲生長期間不照光。

室內發酵之稻草堆肥製作與雞腿蘑菌種下種

堆肥配方爲風乾稻草 2,500 kg，稻桿切成約 3 cm 長，加水使稻桿充分吸足水分及混合硫酸銨 10 kg，假堆積使其軟化，5 天後添加雞糞 500 kg、硫酸銨 50 kg、過磷酸鈣 75 kg、碳酸鈣 50 kg、石膏 125 kg、黃豆粉 25 kg 及米糠 100 kg，於隧道式發酵槽，以自然升溫發酵 16 天 (Chen *et al.* 2001) 後，得到完熟堆肥。稻草堆肥製作二次，配方相同，製作完成之堆肥含水量分別爲 65.8%與 64.37%，每袋分別裝入 2 kg 與 14.2 kg 堆肥，取上述製備完成之雞腿蘑麥粒菌種，分別取 150 g 與 400 g 麥粒菌種與堆肥混合均勻，分別爲 10 重複，每一重複 4 袋；與 6 重複，每一重複 2 袋，移入培養室 14-18 天待菌絲長滿後覆土，調查出菇產量，覆土至出菇日數及生物效率或產菇效率等。試驗重複二次。

木屑菌包栽培基質製作與培養

篩選雜木木屑 300 kg，木屑顆粒粗 (≥ 3.5 mm)：細 (≤ 2.0 mm) 依重量比 2：1，添加按乾重比，木屑：大麥粉：米糠爲 50:35:15 之營養添加物，以碳酸鈣調整 pH 值爲 6.5，含水量調整爲 65%，裝入耐熱塑膠袋每袋 900 g，塑膠包中心以鐵棒（直徑 2 cm）打洞，深約菌包長度的 2/3，套上塑膠環後袋口以棉塞阻隔雜菌，移入電腦自動化程式控制之殺菌釜（廣太原，霧峰）內滅菌（121℃, 60 min），然後移入冷卻室隔夜冷卻後，以人工接種雞腿蘑二菌株木屑原種，每包下菌種量約 25 g，每一重複 4 袋，10 重複，移入培養室 14 天待菌絲長滿後打開菌包，覆約 2-3 cm 泥炭土，降溫刺激出菇，調查出菇產量，覆土至出菇日數及生物效率等。試驗重複二次。

木屑栽培基質塑膠瓶製作與培養

篩選雜木屑 600 kg（木屑顆粒粗：細依重量比 2：1），添加按乾重比，木屑：大麥粉：米糠爲 50:35:15 之營養添加物，以碳酸鈣調整 pH 值爲 6.5，含水量調整爲 64%，以自動裝瓶機（K-50-2，協全，台中）裝瓶（1,100 mL 聚丙烯塑膠瓶，每瓶含基質濕重約 750 g）、打洞、封蓋，移入電腦自動化程式控制之殺菌釜內滅菌，然後移入冷卻室隔夜冷卻後，以自動接種機（NIPPON SEIKI N-7000，精機株式會社，日本）接種雞腿蘑 CC1 菌株之木屑原種，並以輸送帶送至培養室 (18.5-21℃)，定溫培養 35 天，菌絲生長期間不照光。

不同覆土材料處理雞腿蘑太空包對出菇產量之影響

購買菌絲長滿之雞腿蘑 CC1 菌株之太空包（張金海，竹山），培養材料爲木屑 70% (v/v)、米糠 15% (v/v) 與黃豆粉 15% (v/v)。每 8 包爲一處理，計 20 重複，在太空包長滿菌絲後，打開塑膠袋取出棉花並將塑膠袋反折留離培養面 5 cm 高度供覆土用。木屑基質太空包菌絲長滿後，以霧峰田土與泥炭土 (HECO No. 1, Canada) 作覆土處理，覆土材料以碳酸鈣調整 pH 值爲 7.4，覆土厚度爲 3.0 cm。菌包於覆土後，將出菇室溫度控制於 19℃，以超音波加濕機控制相對溼度在 85-90%，室內二氧化碳濃度控制在 1,000 ppm 以下。記錄覆土至出菇日數與出菇周期產量等，並取樣測定基質含水量、覆土酸鹼值等。

不同覆土厚度對於雞腿蘑出菇之影響

稻草雞糞堆肥（配方與製作方法如上述），秤重 14.2 kg 裝入 20 × 30 cm 塑膠袋，混合麥粒菌種約 170 g，移入 22℃ 的培養室培養 35 天，在菌絲長滿基質後覆土；另外以木屑：大麥粉：米糠爲 50:35:15（乾物重）之栽培基質，以自動化瓶栽機械裝填入塑膠瓶，方法如上述，接種雞腿蘑 CC1 菌株，移入 21℃ 的培養室培養 35 天，在菌絲長滿基質後，以自動挖瓶機（MCQA-11，廣太原，霧峰）挖取 120 框（12 個塑膠瓶／框），約 900 kg 培養基質（已長滿菌絲），秤取 14.2 kg 裝入塑膠袋（直徑 40 cm）輕輕壓平後，移入栽培庫房，插入溫度計，以空調冷氣控制培養基質溫度維持在 29℃以下，菌絲重新長滿菌包，以泥炭土 (HECO No. 1, Canada) 作覆土處理，覆土的方式採不覆土、覆土厚度約 1.5 cm，3.0 cm 及覆土厚度約 4.5 cm 四種處理。菌包於覆土後，將出菇室溫度調整於 22℃，5 天後再降溫至 19℃，同時於菌包床面洒水，以超音波加濕機控制相對溼度在 85-90%，室內二氧化碳濃度控制在 1,000 ppm 以下。記錄覆土至出菇日數與出菇周期產量等。

瓶栽與袋栽培對雞腿蘑出菇之影響

木屑栽培基質以自動化裝瓶與滅菌冷卻後（材料配方如上述），接種雞腿蘑 CC1 菌株，移入培養室以 21℃培養 35 天後，菌絲長滿塑膠瓶內之栽培基質後，分成二種處理，第一種處理，以自動挖瓶機挖出塑膠瓶內含菌絲之栽培基質，每袋裝 14.2 kg 菌絲培養基質，6 重複，每重複 2 袋，同

上述，移入栽培庫房，插入溫度計，以空調冷氣控制培養基質溫度維持在 29℃ 以下，菌絲重新長滿菌包後，覆泥炭土約 3.0 cm。第二種處理是以自動刮除機（廣太原，霧峰）將塑膠栽培瓶表層約 2.0-3.0 cm 菌絲層挖除，移入出菇室菇架上後再覆泥炭土，厚度爲約 3.0 cm。試驗重複二次。

刺激出菇之操作與栽培管理

上述各種處理之菌瓶與菌包於覆土後，控制出菇室溫度於 22℃，5 天後再降溫至 19℃，同時於菌包床面洒水，以超音波加濕機控制相對溼度在 85-90%，室內二氧化碳濃度控制在 1,000 ppm 以下。記錄覆土至出菇日數與出菇周期產量等，與測定基質含水量、覆土酸鹼值等。

生物效率與產菇效率之計算

生物效率 (%)＝（採收菇體之鮮重 ÷ 接種時之栽培基質乾重）× 100

產菇效率 (%)＝（採收菇體之鮮重 ÷ 菌絲長滿後出菇前之栽培基質乾重）× 100

結　　果

溫度對雞腿蘑菌絲生長之影響

雞腿蘑 CC1 與 CC2 二個菌株在 PDA 培養基上，在低於 12℃或高於 36℃均不會生長，最適生長溫度，CC1 菌株爲 20-28℃，CC2 菌株則在 20-24℃，二個菌株略有差異（圖 1），此結果與前人研究略有差異，可能是品系不同所致。

菌株之出菇產量與生物特性之比較

以木屑營養基質塑膠袋栽培時，CC1 菌株子實體產量每包平均 219.0 g，生物效率達 69.3%，顯著高於 CC2 菌株產量 194.5 g/包，生物效率 61.6%；而覆土至出菇所需天數則以 CC2 菌株 26 天較 CC1 菌株爲快（表 1）。以堆肥栽培時，出菇產量則發現以 CC2 菌株的產量每包達 379.3 g，生物效率達 55.5%，顯著高於 CC1 菌株的產量每包達 281.3 g，生物效率達 41.1%，覆土至出菇天數及完成首周期日數則較 CC1 菌株長，（表 2）。

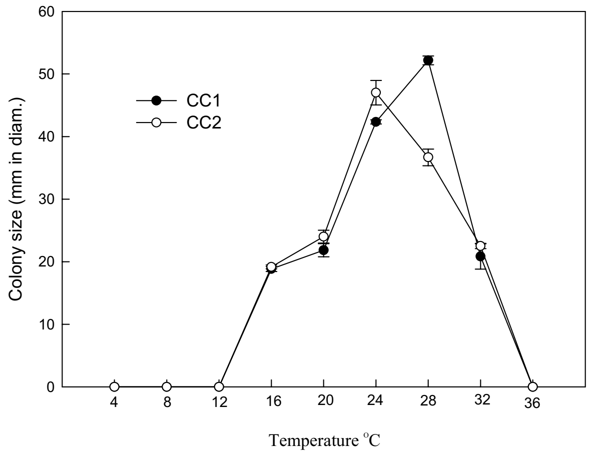


圖 1. 溫度對雞腿蘑 CC1 與 CC2 二菌株菌絲生長之影響（七天之結果）。

Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Coprinus comatus* isolates CC1 and CC2 on PDA plates for 7 days. (Bar:Standard deviation)

表 1. 以木屑營養基質栽培雞腿蘑二菌株對產量與出菇特性之比較 [y]

Table1. Comparisons of productivities and fruiting characteristics of the two strains of *Coprinus comatus* CC1 and CC2, cultivated on sawdust substrates [z] with plastic bag cultivation technique [y]

Strain	Average yield / bag (g)	Biological efficiency (%)	Days from casing to 1st harvest	Days for finishing harvest
CC1	219.0 a[x]	69.3 a	29.0 a	45.0 a
CC2	194.5 b	61.6 b	26.0 b	47.0 a

[z] Sawdust substrates contained sawdust, barley flour and rice bran at a ratio of 50:35:15 by dry weight. Each bag was 900 g and water content of the substrate was 64.9%.

[y] Each strain had 10 replicates and each replicate consisted of 4 bags.

[x] Means with the same letter in the same column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表 2. 以稻草堆肥栽培雞腿蘑 CC1 與 CC2 二菌株對產量與出菇特性之比較 [y]

Table 2. Comparisons of productivities and fruiting characteristics of the two *Coprinus comatus* strains CC1 and CC2, cultivated on rice straw compost [z] with plastic bag cultivation technique [y]

Strain	Average yield / bag (g)	Biological efficiency (%)	Days from casing to 1st harvest	Days for finishing harvest
CC1	281.3 b[x]	41.1 b	26.0 b	48.0 b
CC2	379.3 a	55.5 a	30.0 a	52.0 a

[z] Rice straw compost containing 20% chicken manure before composting. Each bag contained 2.0 kg of compost of which water content was 65.8%.

[y] Each strain had 10 replicates and each replicate consisted of 4 bags.

[x] Means with the same letter in the same column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

不同覆土材料對於雞腿蘑太空包出菇之影響

比較一般田土及泥炭土，發現這二種覆土材料均可作雞腿蘑出菇栽培之用，而由表 3 發現泥炭土對於雞腿蘑 CC1 菌株出菇所需日數及菇體產量均優於一般田土，且在產量與生物效率上具有顯著性差異，但二種材料對於第一周期出菇採收天數，則田土比泥炭土短（表 3）。第二週期出菇產量不論田土或泥炭土爲覆土材料，皆明顯下降，首周期產量佔二個週期總產量之 98.6-99.1%。

不同覆土厚度對於雞腿蘑出菇之影響

以泥炭土爲覆土材料，在木屑與堆肥二種栽培基質，四種覆土厚度處理，結果發現雞腿蘑 CC1 菌株在不覆土情況下，均無子實體產生，顯示覆土對其出菇有必要性；而不論是以堆肥或木屑爲栽培基質，覆土厚度均以 3.0 cm 具有較佳的子實體產量與生物效率，在木屑爲栽培基質，覆土深度在 1.5 cm，每袋也具有 2.5 kg 菇體產量與 46.1%生物效率，但是覆土 4.5 cm 則嚴重降低至 1.7 kg，生物效率僅爲 31.0%，以堆肥栽培的，覆土厚度在 4.5 cm 時產量與生物效率顯著的降低 50%以上（表 4），同時發現覆土厚度愈深超過 3.0 cm 以上，不論以木屑營養基質或堆肥作栽培對於出菇所需日數有顯著性的延遲現象，首周期完成天數上則不同覆土厚度無顯著性差異，以木屑爲營養基質栽培則少於於用堆肥栽培。

瓶栽與袋栽模式對雞腿蘑出菇之影響

利用自動化瓶栽方式栽培與塑膠袋方式栽培雞腿蘑，結果發現袋栽模式對於雞腿蘑 CC1 菌株生物與產菇效率顯著優於瓶栽模式，袋栽的出菇每包平均產量爲 3,141.0 g，生物效率 57.3%；而瓶栽每瓶產量只有 100.5 g，生物效率 43.2%。在產菇效率上袋栽方式可達 62.1%，而瓶栽方式僅有 48.0%，二者差異極爲顯著。覆土至出菇天數，袋栽只需 23 天，而瓶栽則需 26 天，周期間隔天數也以袋栽較短，二者具顯著性差異（表 5）。

表 3. 不同覆土材料對雞腿蘑出菇特性之影響

Table 3. Comparisons of fruiting characteristics of the CC1 strain of *Coprinus comatus* cultivated on sawdust media with peat moss or field soil as the casing material

Casing material[z]	1st flush Average yield (g/bag)	Average yield (g/cm^2)	Production efficiency (%)[y]	Days from casing to fruiting	Days for 1st flush harvest	Days between 1st to 2nd flush	Rate of 1st flush/total yield (%)
Peat moss	251.2 a[x]	3.2 a	62.2 a	26.1 b	5.5 a	16.0 a	98.6 a
Field soil	223.8 b	2.8 b	55.4 b	27.9 a	4.0 b	14.0 a	99.1 a

[z] Peat moss (HECO No. 1, Canada) and field soil (Wufeng area) were adjusted to pH 7.42 with calcium carbonate. The depth of casing layer was 1.5-3.0 cm. Cultivated area of the bag container was 78.54 cm^2.

[y] Production efficiency = (fresh mushroom weight ÷ dry weight of substrate before fruiting) × 100%.

[x] Means with the same letter in the same column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表 4. 比較堆肥和木屑營養基質栽培之雞腿蘑以不同覆土厚度處理對產量與出菇特性之影響[z]

Table 4. Effects of the depth of casing layer on the productivities and fruiting characteristics of the *Coprinus comatus* strain CC1 cultivated on rice compost and sawdust medium, respectively[z]

Depth of casing layer (cm)[y]	Average yield (g/bag)		Biological efficiency (%)[x]		Production efficiency		Days from casing to fruiting		Days for 1st flush harvest	
	C[x]	S	C	S	C	S	C	S	C	S
0	0	0	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd
1.5	nd	2527.1 b[w]	nd	46.1 b	nd	50.0 b	nd	23.0 b	nd	4.5 a
3.0	1140.1 a	3141.0 a	22.6 a	57.3 a	25.3 a	62.1 a	25.3 a	23.0 b	6.0 a	3.5 a
4.5	528.9 b	1708.1 c	10.5 b	31.0 c	11.7 b	33.8 c	27.8 a	25.5 a	7.0 a	4.2 a

[z] Each plastic bag contained 14.17 kg compost or sawdust media. The compost water content at inoculation and before fruiting were 64.37% and 68.13%, respectively. The sawdust medium water content at inoculation and before fruiting were 61.3% and 64.33%, respectively. There were 6 replicates for each treatment. Each replicate contained 2 plastic bags.

[y] Peat moss (HECO No. 1, Canada) was adjusted to pH 7.45 with calcium carbonate.

[x] C = rice compost which contained 20% chicken manure before composting; S = sawdust medium which contained 50% sawdust, 35% barley flour and 15% rice brain (dry weight); nd = no data.

[w] Means with the same letter in the same column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

表 5. 比較塑膠瓶栽與塑膠袋栽二種方式栽培對雞腿蘑 CC1 菌株出菇特性之影響 [z]

Table 5. Comparisons of productivities and fruiting characteristics of the *Coprinus comatus* strain CC1 cultivated on sawdust medium with plastic bag or bottle cultivation technique [z]

Container[y]	Average yield (g)	Average yield (g/cm^2)	Biological efficiency (%)[c]	Production efficiency (%)	Days from casing to fruiting	Days for 1st flush harvest	Days between 1st to 2nd flush
Bag	3141.0	2.5	57.3 a[x]	62.1 a	23.0 b	6.0 b	9.5 b
Bottle	100.5	3.5	43.2 b	48.0 b	26.0 a	7.7 a	13.4 a

[z] Each plastic bag contained 14.2 kg sawdust medium containing 50% sawdust, 35% barley flour and 15% rice brain (dry weight). The water content at inoculation and before fruiting were 61.3% and 64.33%, respectively. Each plastic bottle contained 642.5 g sawdust medium. The water content at inoculation and before fruiting were 63.8% and 67.4%, respectively. There were 6 replicates for each treatment. Each replicate consisted of 2 plastic bags or 36 plastic bottles. Peat moss (HECO No. 1, Canada) was adjusted to pH 7.45 with calcium carbonate and the depth of casing layer was 1.5-3.0 cm.

[y] Cultivated areas of bag and bottle were 1256.64 and 28.744 cm^2, respectively.

[x] Means with the same letter in the same column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

討　論

台灣近年來已有少數菇農開始栽培雞腿蘑，目前以南投、埔里、魚池、草屯與竹山地區為主，年產量不超過 60 公噸 (Ho & Peng 2006)。但是一般菇農對於此菇的栽培特性仍不熟悉，本篇研究就品系、栽培基質、覆土材料、覆土深度與栽培容器加以探討。在二個品系出菇特性上，以木屑太空包栽培時，CC1 菌株的產菇生物效率高於 CC2 菌株，而以稻草堆肥栽培時則相反，CC2 菌株高於 CC1 菌株，顯示此二品系對於木質纖維分解能力與出菇產能上具有品系間差異，CC1 菌株比 CC2 菌株有較高的木質纖維分解能力。在栽培基質方面，雞腿蘑是屬於草腐性的菌類，對於木質纖維素分解能力較其他蕈菇菌弱 (Varma & Mathur 1995)，一般認為雞腿蘑較適合以堆肥基質作栽培基質 (Balázs & Kovácsné 1986)，但是由試驗結果發現，雖然堆肥的碳氮比 (C/N) 為 18.3 而木屑基質碳氮比為 79.5（未發表），本菇菌可以在稻草堆肥上生長與出菇，但是也可以在以木屑營養添加物之塑膠瓶（塑膠袋）或是太空包上生長，而且生物效率上，卻比堆肥為佳，不像土生菌類之洋菇，只能在堆肥上生長，顯示本菇菌對於資材選擇上比其他菇類為廣。

由表 4 試驗結果發現雞腿蘑出菇特性與洋菇相似，具有不覆土不出菇之特性。覆土對於本菇菌出菇、產量與品質上有重大的關係。覆土對堆肥栽培菇類生長發育的主要影響是改變菌床的生態環境，促進菌絲由營養生長轉為生殖生長，進而誘導菇蕾形成 (Yang 2004)。菇菌子實體的形成是由菌絲生長至分化誘導形成菇蕾，再轉成小菇最後形成子實體，而覆土對產菇的作用機制目前有許多不同論點，被認為的有下列幾點，如 Liu (1995) 認為覆土層可固定菇體的生長；Griensven (1988) 認為覆土層供給菇體生長時所需要的水分、可防止堆肥中水分蒸發，以利菇類菌絲生長與菇體發育；而 Paul & Chilton (1983) 則認為堆肥層與覆土層內部保持穩定的微氣候有益菇體形成；覆土中之微生物具有刺激促進子實體的產生 (Chen 1986)，Li (1994) 認為子實體的形成需有一定量的二氧化碳，覆土層內的二氧化碳與栽培室二氧化碳濃度產生差異，有益於子實體形成。而本菇菌與洋菇同

爲土生菌類 (Fang *et al.* 2003)，在菌絲長滿 2 個月，即使加以降溫灑水刺激，依然無法出菇，對於何種原因才是雞腿蘑出菇的必要因子，仍需進一步研究探討。

由表 3 試驗資料得知，雞腿蘑最適覆土種類以泥炭土爲最佳，田土較差，這可能與保水性及透氣性有關，覆土材料的組成和種類會影響出菇品質與產量，尤其是保濕能力是決定覆土效果之重要因素。一般土壤如沙土通氣性良好但保水力差，粘土則反之，保水力強但通氣性不良，而泥炭土有機質含量高達 39.3%，比土壤高 19 倍，富含纖維素與木質素，結構疏鬆、吸水力強、保水量多及通氣性佳等特點，被歐美國家洋菇栽培場大量使用，以提高產量，爲目前最理想之覆土材料 (Yang 2004)。如上述般，必須在適當的水分與微氣候條件方有利於子實體形成。而本試驗結果覆土厚度在 3.0 cm 具有最佳的產能表現與此結果與前人研究相同 (Yang *et al*. 2004)，覆土過深可能二氧化碳濃度太高，不利於出菇，覆土太淺則微氣候變化太大及無較佳之二氧化碳濃度差而不利菇蕾的形成。而栽培容器對於出菇之生物效率與產菇效率之表現上以塑膠袋袋栽爲佳，主要在有效出菇面積以塑膠袋 1256.6 cm^2 大於瓶栽 28.7 cm^2，但在單位栽培面積的產能上卻是瓶栽高於袋栽，主要原因在於瓶栽面積小，而裝入之基質量（約 22.6 g/cm^2），換算供給生長物質量高於塑膠袋栽（約 11.3 g）所致，因此，未來在栽培雞腿蘑時必須注意栽培的有效出菇面積與最適基質添加量，避免基質量足夠而因出菇面積不足以致影響整體產能表現；同時在覆土至出菇時間上、第一周期及第一周期至第二週期所需天數表現，皆以袋栽爲佳，主要原因在於瓶栽時，因塑膠瓶容器太小以致覆土的量少，在於環控栽培時水分含量易被吹乾，以致延緩出菇時間，完成第一周期與周期間隔時間會延長。雖然以瓶栽方式栽培雞腿蘑有此問題，但是對於菇類自動化瓶栽場，只要對於覆土層的保濕加以注意，或許也可加以修改應用而可栽培此一菇蕈。

雞腿蘑栽培中另一重的因子爲水分管理，菌絲長滿栽培基質後至覆土菇蕾形成前之階段，覆土層可大量洒水，有利於子實體發育，但在菇蕾形成後至子實體成熟採收的這段時期，雞腿蘑對水極爲敏感，若洒水噴到在子實體上很容易引起褐斑，嚴重時蕈傘會爛掉，影響菇體品質與外觀至鉅。因此，雞腿蘑在菇蕾產生時不可灑水，確保菇體品質與商品價值。雞腿蘑在子實體成長階段，相對溼度低於 90%，蕈傘部位易產生鱗片狀的反捲，降低商品價值，因此，相對溼度應保持在 90-93%，較不易產生反捲的鱗片，同時也可降低菇床水分的蒸發，而不致使子實體生長缺水影響產能表現。

台灣地狹人稠，加入世界貿易組織 (WTO) 後農產品易受外來農產品之競爭，因爲雞腿蘑在子實體成熟後，易發生自溶成墨汁狀 (Bush 1974)，失去商品價值，具有易腐不耐儲運之特性，如同新鮮洋菇般具有相當的地域性，對於發展此種菇產業，面對國外進口菇類之競爭具有較大之本地生產優勢，同時，因具有耐低溫及不覆土不出菇之特性，加以利用可作爲調節產能之效果，有助於本土菇農之發展。

誌　　謝

本研究承蒙農委會農業科技計畫－食藥用菇類品種改良與栽培技術改進經費支持，得以完成，並感謝參與研究工作之菇類研究室工作同仁的協助。

引用文獻 (Literature cited)

Balázs, S., and G. M. Kovácsné. 1986. Production trials with *Coprinus comatus*. A kézirat érkezett. 9:5-9.

Bao, S. L., Z. Q. Ma, Z. B. Wang, W. X. Xu, and B. R. Guo. 1998. Effect of pH on hypha growth of *Coprinus comatus*. Journal of Jilin Agricultural University 20:191. (in Chinese)

Bao, Z. H. 1998. Analysis of nutrition composition in *Coprinus comatus* and peroxidase isozyme electrophoresis. Acta Edulis Fungi 4:23-25. (in Chinese with English abstract)

Bush, D. A. 1974. Autolysis of *Coprinus comatus* sporophores. Experientia 30:984-985.

Chen, B. Y. 1986. Modern Mushroom Planting. Wu-Zhou publishing house. Taipei. 407 pp. (in Chinese)

Fang, F., J. D. Song, and X. L. Jiang. 2003. The Complete Works of Edible Fungus Produces. Science Tech. Pub. House of Jiangsu Press, Nanjing. 446 pp. (in Chinese)

Griensven L. J. L. D. 1988. The Cultivation of Mushrooms. Mushroom Experimental Station. Horst. The Netherlands. 495 pp.

Guo, B. R., J. M. Zhang, X. P. Zhang, W. X. Xu, and S. L. Bao. 1998. Effect of the water volume in media on hypha growth of *Coprinus comatus*. Journal of Jilin Agricultural University 20:189. (in Chinese)

Guo, B. R., S. L. Bao, Y. Li, X. A. Wang, and W. X. Xu. 1998. The zoological experimental study on the bloodsugar- decrease effect of *Coprinus comatus*. Journal of Jilin Agricultural University 20:188. (in Chinese)

Ho, M. S., and J. T. Peng. 2006. Edible mushroom production in Taiwan. Newsletter of the International Society for Mushroom Science 104:7-10.

Huang, N. L. 1993. Edible Fungi Cyclopaedia. Agricultural Publishing House. Beijing. 139 pp. (in Chinese)

Li, Q. J. 1994. Glossy Ganoderma and Cultivation of Edible Fungus. Da-Kun Publishing House. Tainan. Taiwan. 223 pp. (in Chinese)

Liu, K. Q., S. H. Li, B. J. Liu, L. Ding, Y. W. Chen, B. J. Lu, and Z. X. Li. 2001. New technology of cultivating *Coprinus comatus*. p.249-250. *in:* the Sixth National Symposium on Edible Fungi. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences Pub. Shanghai. (in Chinese)

Liu, P. T. 1995. The cultural mechanism and effects of casing soil of edible fungus. The edible fungus of Jiangsu 16:33-34. (in Chinese)

Paul, S., and J. S. Chilton. 1983. A practical guide to growing mushroom at home. Agarikon press. Washington. 415 pp.

Varma, S. K., and R. S. Mathur. 1995. Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. Indian Phytopath. 48:483-488.

Wang, B. J., and Q. P. Min. 2002. Techniques of cultivating *Coprinus comatus* with Maize straw. Edible Fungi of China. 4:32-33. (in Chinese)

Wang, S. F., Q. R. Huang, Q. M. Bu, and J. Miao. 2001. Experiment of new techniques of culitivating *Coprinus comatus*. Edible Fungi of China. 4:14-16. (in Chinese with English abstract)

Winterboer, A., and A. Eicker. 1983. A preliminary report on the nutrient content of *Coprinus comatus*. S. Afr. J. Bot. 2:83-84.

Xu, C. S., G. Yanng, W. X. Xu, S. L. Bao, and B. R. Guo. 1998. Effect of temperature on hypha growth of *Coprinus comatus*. Journal of Jilin Agricultural University 20:190. (in Chinese)

Yang, G. L. 2004. The Pandect of mushrooms production. China Agricultural Publishing House Beijing. 596 pp. (in Chinese)

Yang, X. H., W. M. Zhang, S. G. Guan, Z. M. Mai, and C. R. Nie. 2004. Effect of the depth of soil earthed up on the yield of *Coprinus comatus*. Edible Fungi of China 2:27-28. (in Chinese with English abstract)

Ying, J. Z., X. L. Mao, and Q. M. Ma. 1987. Illustrated Handbook of Chinese Medicinal Mushroom. Science Press. Beijing. 579 pp. (in Chinese)

Effects of Culture Media and Casing Materials on Fruiting Characteristics of *Coprinus comatus*[1]

Jin-Tong Chen[2,3], Wei-Sung Li[2] and Kaun-Tzer Wu[2]

Abstract

Chen, J. T., W. S. Li, and K. T. Wu. 2007. Effects of culture media and casing materials on fruiting characteristics of *Coprinus comatus.* J. Taiwan Agric. Res. 56:316-326.

Coprinus comatus, also known as the shaggy ink cap or shaggy mane mushroom, is the type species of the genus *Coprinus*, in the Agaricaceae. It is a saprophytic and edible fungus. CC1 and CC2 strains of *C. comatus* were cultivated separately on rice straw compost consisting of 80% rice straw and 20% chicken manure or sawdust medium consisting of 35% barley flour, 15% rice bran and 50% sawdust. When cultured on sawdust medium, the biological efficiency and mushroom yield produced by CC1 strain were higher than those produced by CC2 strain. However, when cultivated on rice straw compost, the biological efficiency and mushroom yield produced by CC2 strain were higher than those produced by CC1 strain. Our results also showed that casing with peat moss was better than casing with field soil in increasing the mushroom yield. When casing depth was 0 cm, no primordia were formed. The casing depth of 3.0 cm was better than that of 1.5 or 4.5 cm in mushroom yield, biological efficiency and production efficiency for both rice straw compost and sawdust medium. For the cultivation of *C. comatus*, the plastic bag which contained bigger growing area for fruiting was better than plastic bottle in mushroom yield, biological efficiency and production efficiency.

Key words: *Coprinus comatus*, Compost, Sawdust, Casing, Fruiting.

1. Contribution No.2305 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted:December 17, 2007.
2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Associate Researcher, Plant Pathology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding author, e-mail:jtchen@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23338162.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):327-337 (2007)

以RAPD及SSR分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析及種原鑑定[1]

陳述[2,4] 范宗宸[3] 林俊義[2]

摘　要

陳述、范宗宸、林俊義。2007。以 RAPD 及 SSR 分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析及種原鑑定。台灣農業研究 56:327-337。

本研究之植物材料為台灣目前所保存的 21 個樹薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 種原品種（系），首先利用逢機增殖多型性 (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) 分子標誌，進行樹薯種原遺傳歧異分析，以探討各種原間之親緣關係。之後再進一步加以簡單序列重複 (Simple Sequence Repeat; SSR) 分子標誌進行種原鑑定，主要目的在於期望能將 21 個樹薯品種（系）進行完全地區分鑑別。RAPD 試驗結果所獲得的 156 條多型性片段，經群集分析，21 個樹薯種原可區分成為 4 群，以提供育種參考。而以 11 組 intra-SSR 引子進行試驗，獲得 32 條多型性片段，經由這些多型性片段的組合，可成功地將 21 個樹薯品種（系）進行完全的區分，顯示 SSR 分子標誌在樹薯種原鑑定，為一強而有力之工具。

關鍵詞：樹薯、遺傳歧異、種原、鑑定、逢機增殖多型性、簡單序列重複。

前　言

樹薯為大戟科 (Euphorbiaceae) 一年或多年生之熱帶作物，起源於墨西哥南部、瓜地馬拉及巴西的亞馬遜河流域，為非洲近撒哈拉等土壤貧瘠地區，約 5 億以上人口百分之 60 的熱量來源 (FAO and IFAD 2000)。此外，樹薯亦為重要能源作物，面對目前全球能源危機日漸嚴重，急需開發生質能源，樹薯與玉米、甘藷等皆屬於澱粉類作物，這些作物透過發酵過程，可生產生質乙醇（酒精），供作燃料或與汽油混合後，提供汽車使用 (Lin 2007)。

學者曾就蛋白質層次的同功異構酵素 (isozyme) 針對樹薯進行鑑定 (Hussain *et al.* 1987; Ramirez *et al*. 1987; Lefevre ＆ Charrier 1993)，但受限於可供鑑定的遺傳標誌基因座有限，所以產生的多型性不夠而無法進行有效的鑑定區分。由於 DNA 層次可提供大量的分子標誌數目，因此無論進行樹薯鑑定或遺傳歧異分析，都是很好的工具 (Beeching *et al.* 1993)。曾經利用於樹薯的分子標誌有：RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Fregene *et al.* 1994)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Marmey *et al.* 1994; Wong *et al.* 1997)、AFLP (Amplifided Fragment Length Polymorphism) 等 (Roa *et al.* 1997; Wong *et al.* 1998; Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1999; Elias *et*

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2306 號。接受日期：96 年 12 月 15 日。
2. 行政院農業委員會農業試驗所作物種原組助理研究員、農業試驗所所長。
3. 亞洲大學生物科技系副教授。
4. 通訊作者，電子郵件：cshu@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23331673。

al. 2000)。在這些 DNA 分子標誌中，SSR 爲較特殊的分子標誌，其遺傳機制主要是根據高等生物具有很高比例的 DNA 重複序列，不但在不同物種間重複序列的數目有很大遺傳變異，在不同品種間亦有很大的差異。SSR 分子標誌又可分爲兩種類型，根據聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 反應之產物不同，若屬於重複序列內產物之擴增，稱爲 intra-SSR；至於重複序列之間的產物擴增，稱爲 inter-SSR 或 ISSR。學者們發現樹薯種原具有 GA 簡單重複序列 $(GA)_{14}$ (Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1998)。因此國際熱帶農業中心 (International Center for Tropical Agriculture; CIAT) 便針對樹薯應用 SSR 進行遺傳歧異分析與種原鑑定 (Chavarriaga-Aguirre *et al.* 1998, 1999; Roa *et al.* 2000)。

由於樹薯可作爲能源作物，重要性將日益提升。本研究之目的係針對台灣目前所保存的 21 個珍貴的樹薯種原品種（系），先利用可產生大量條帶的 RAPD 分子標誌，進行樹薯種原之遺傳歧異度分析，以探討各種原間之親緣關係；之後再進一步以 intra-SSR 分子標誌，進行種原鑑定，主要目的在於期望能將所有的 21 個種原都可以進行完全的區分鑑別，以做爲種原保育之依據。

材料與方法

供試植物材料

本試驗所採用之樹薯種原係保存於台東區農業改良場，包括：台南育 1-7 號、埔里選 1 號、烏枝仔、甜木薯、Hicran、Roti、Lunclnan、Bitter、Chirgwi、Veipueen、Green twig、Black twig、Turai、Matnenot、Medan 等，共計 21 個品種（系）。

種原性狀調查

調查項目包括：葉色、葉脈色、葉柄色、葉片長／寬比值、莖圍、分支數、株高等。

植物體基因組 DNA 之萃取

主要參考 Doyle & Doyle (1990) 所提之方法進行部份修改以萃取植物體基因組 DNA。取約 0.25 g 植株嫩葉，以液態氮研磨後迅速加入 500 µL 已預熱至 60℃的 DNA 萃取緩衝液，置於 60℃水浴 1 小時，並間歇搖動。取出離心管靜置冷卻至室溫後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液倒至另一新的 1.5 mL 小離心管中，並加入 500 µL chloroform / isoamylalcohol (24:1) 溶液混勻，再以 14,000 rpm 離心 20 分鐘使兩液相分離，取上清液加入 300 µL -20℃的 isopropanol 以沉澱 DNA。以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 1 mL wash buffer (75% ethanol, 10 mM ammonium acetate) 混勻，於 14,000 rpm 離心 10 分鐘後倒掉上清液，將 DNA 沉澱進行乾燥後加入 50 µL 無菌水溶解，並加入 RNase (10 ug/mL) 於 37℃下反應 30 分鐘。所抽得的 DNA 均經 OD 值測定與電泳，以判別 DNA 的濃度與品質檢測。

RAPD 試驗

本研究共採用 14 個逢機引子，即 OPERON kit 之 OPC 1, OPC 5, OPG 2, OPG 8, OPG 13, OPG 18, OPO 10, OPO 13, OPO 20, OPW 2, OPW 4, OPW 6, OPW 13, OPY 1 等。PCR 反應係參考 Oard & Dronavalli (1992) 略作修改，本試驗反應總體積爲 30 µL，內含 1.2 unit *Taq* polymerase (Promega)、1X PCR buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.1% Triton 100)、2.5 mM $MgCl_2$、200 µM dNTP、0.2 µM primer 及 50 ng template DNA。PCR 反應係於 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600 進行，反應溫度條件設定爲前 2 循環：94℃，3 min；40℃，1 min 20 sec；72℃，1 min 30 sec。之後續以 94℃，1 min；40℃，1 min；72℃，2 min 的反應溫度條件進行 43 個循環。最後置於 72℃，

5 min。反應完成後自動降溫保存於 4℃下。增殖產物之偵測以 2% agarose 在 1X TAE buffer (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳，並以 DNA molecular weight marker XVI (250 bp ladder)（Roche，德國）做爲分子量標誌，電泳槽係採用 Mupid-2（Cosmo，日本），電壓設定 100 伏特，經電泳 20-30 分鐘結束後置於 0.5 mg/mL 的 ethidium bromide 染色 10-20 分鐘，以 UV 光檢視 agarose 膠體上的 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System（Alpha Innotech Corporation，美國），以進行後續的資料分析。

集群分析係將上述貯存於 IS 2000 Digtal Imaging System 中的 RAPD 產物電泳影像 TIF 檔，以 GelCompar 軟體 (Applied Maths BVBA) 將電泳條帶結果轉換爲＋/－型態之資料型式，再加以文書處理轉成 1/0 之資料型式。於 SAS 軟體中撰寫程式，將此 1/0 的資料檔，以 Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908) 爲基礎，再以 SAS 軟體之 CLUSTER procedurce UPGMA 進行集群分析。

SSR 試驗

本研究共採用 13 個 SSR 引子，即 SSRY9，SSRY11，SSRY12，SSRY14，SSRY25，SSRY49，SSRY63，SSRY68，SSRY75，SSRY76，SSRY91，SSRY93，SSRY106 (Chavarriaga-Aguirre *et al*. 1998)。PCR 反應係參考 Litt ＆ Lutty (1989) 略作修改，本試驗反應溶液總體積爲 30 μL，內含 1.2 unit Fast Start Taq DNA polymerase (Roche)、1 × PCR buffer (Roche)、2.5 mM $MgCl_2$、200 μM dNTP、2.5 μM primer 及 50 ng template DNA。PCR 反應係於 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600 進行，反應溫度條件設定爲第 1 循環：94℃，3 min；之後續以 94℃，1 min；53℃，2 min；72℃，2 min 的反應溫度條件進行 30 個循環。最後置於 72℃，5 min。反應完成後自動降溫保存於 4℃下。經 PCR 反應增殖之 DNA 產物，以 3.25%的 agarose 在 1X TBE buffer 中進行電泳 (Mupid-2 Cosmo)，而後將電泳膠片置於 ethidium bromide 中染色 20-30 min，再以 UV 光檢視膠體上的 DNA 擴增片段，並將影像貯存於 IS2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation)。

結　果

樹薯種原性狀調查

本研究針對樹薯種原性狀調查的結果詳如表 1。21 個樹薯品種（系）之葉色皆爲綠色；葉脈及葉柄的顏色則有紅色及綠色之分，就葉脈與葉柄色之組合，可將樹薯種原區分爲四種型態，葉脈與葉柄皆爲紅色的種原占最多數，共有 9 個，包括：台南育 1、5、6、7 號，以及埔里選 1 號、甜木薯、Bitter、Chirgwi 與 Medan。其次爲葉脈與葉柄皆爲綠色的種原共有 8 個，即台南育 2、3、4 號，以及 Hicran、Roti、Veipueen、Green twig 與 Turai。葉脈綠色而葉柄紅色的種原有烏枝仔、Lunclnan 與 Matnenot。葉脈紅色而葉柄綠色的種原只有 Black twig。

此外，表 1 結果亦顯示樹薯各品種（系）之間在葉片的長／寬比、莖圍、分支數並無較明顯可辨別的差異。21 個樹薯品種（系）的株高分布範圍，平均在 131±23.84 cm 至 236±27.50 cm 之間，高達 200 cm 以上的樹薯品種（系）有台南育 4 號、Bitter、Turai、Matnenot 及 Medan 等。

應用 RAPD 分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析

本研究首先經由篩選獲得了 14 個逢機引子，這些引子主要特色爲可在 21 個樹薯種原間產生具有多型性且再現性穩定的條帶。RAPD 試驗共計產生 187 條 DNA 擴增片段，分子量介於 297-2951 bp 之間，其中有 156 條爲具多型性的片段。這些多型性片段經群集分析，當兩群之間最小距離大於 0.93 時，可明顯將 21 個樹薯種原區分爲 4 群（圖 1），提供瞭解各品種（系）之間的親緣關係，以作爲後續育種之參考。

表 1. 樹薯種原之性狀調查

Table 1. The characteristics of cassava germplasm

Label	Varieties/lines	Color ^{z} Leaf	Vein	Petole	Leaf ratio of length/width	Stalk Diameter (cm)	No. of branch	Plant height (cm)
1	Tainanyu No.1	G	R	R	0.7	7.80±1.9	3.3	155±13.2
2	Tainanyu No.2	G	G	G	0.6	7.20±0.4	3.3	133±7.4
3	Tainanyu No.3	G	G	G	0.7	6.93±1.3	3.3	166±3.5
4	Tainanyu No.4	G	G	G	0.7	6.80±1.2	2.7	227±40.4
5	Tainanyu No.5	G	R	R	0.7	7.93±1.5	2.3	183±12.6
6	Tainanyu No.6	G	R	R	0.6	6.28±1.2	2.6	151±10.6
7	Tainanyu No.7	G	R	R	0.6	7.45±1.5	3.0	146±14.9
8	Puli SEL.1	G	R	R	0.7	7.45±1.9	3.5	141±28.8
9	Wu Chih Tsai	G	G	R	0.6	5.93±0.9	2.7	132±11.7
10	Sweet	G	R	R	0.6	6.53±0.5	3.3	147±12.3
11	Hicran	G	G	G	0.6	6.62±1.8	3.2	131±23.8
12	Roti	G	G	G	0.7	5.80±1.6	4.0	139±8.9
13	Lunclnan	G	G	R	0.6	7.93±2.8	4.0	182±31.8
14	Bitter	G	R	R	0.7	7.50±2.4	3.0	236±27.5
15	Chirgwi	G	R	R	0.7	6.15±1.6	2.5	171±5.0
16	Veipueen	G	G	G	0.8	7.27±0.2	2.3	157±3.6
17	Green twig	G	G	G	0.6	7.93±1.1	1.7	183±15.3
18	Black twig	G	R	G	0.6	8.20±2.7	3.7	151±18.3
19	Turai	G	G	G	0.6	9.50±0.7	2.0	225±35.4
20	Matnenot	G	G	R	0.6	8.20±0.4	3.3	178±0.3
21	Medan	G	R	R	0.7	7.25±2.5	2.3	206±31.5

^{z} G=Green; R=Red.

應用 SSR 分子標誌進行樹薯種原品種（系）鑑定

本研究係直接使用 Agarose 將距離相近的多型性 intra-SSR 片段進行區分，爲試驗技術之一大突破（圖 2），且所得之多型性片段均經定序結果確認其 intra-SSR 之序列。本試驗初始共計使用了 19 組 SSR 引子，但可在 21 個樹薯種原間產生多型性的引子僅 11 組（表 2），產物分子量介於 255-1314 bp 之間，共可產生 32 條多型性片段，其中甚至可獲得 6 條品種（系）特有的專一片段。而綜合 11 組 intra-SSR 引子所產生之多型性片段的組合，可逐步地將 21 個樹薯品種（系）進行完全的區分。

以下便針對表 2 的研究結果，逐步進行種原鑑別的討論。首先，其中有四個品種（系）各具有品種自己的特殊專一條帶，因此可與其餘的 20 個品種（系）進行區別（本研究共計 21 個品種（系））。這四個品種（系）爲：Hicran（代號 11）、Lunclnan（代號 13）、Matnenot（代號 20），以及 Medan（代號 21）。

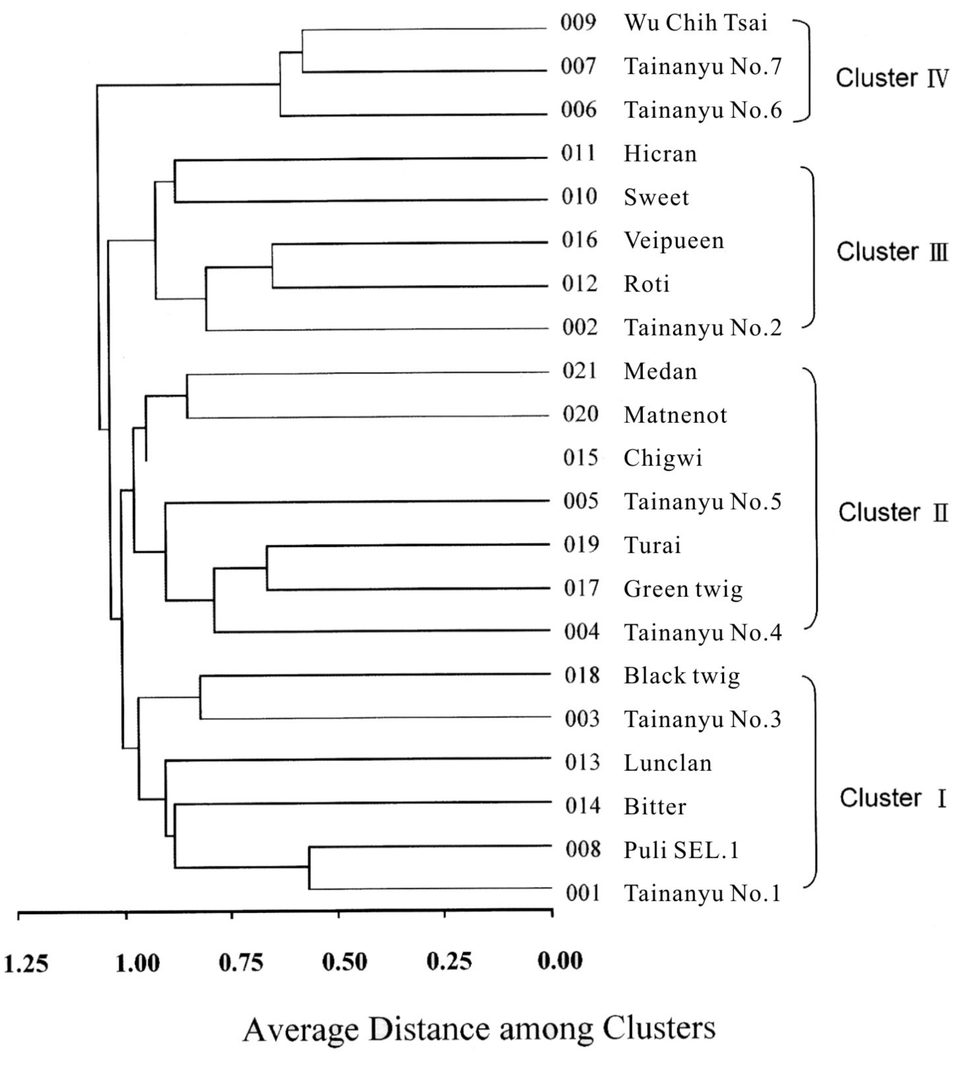


圖 1. 樹薯種原 RAPD 以 UPGMA 方法進行之群集分析樹狀圖。
Fig. 1. Dendrogram of cluster analysis of cassava germplasm using UPGMA method based on RAPD.

Hicran 品種（系）（代號 11）應用 SSRY12 爲引子組時，於 255 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶，而其餘 20 個品種（系）於該位置皆無條帶，故可輕易將 Hicran 與其它樹薯品種（系）區分。Lunclnan 品種（系）（代號 13）應用 SSRY76 爲引子組時，於 259 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶；Matnenot 品種（系）（代號 20）應用 SSRY49 爲引子組時，於 290 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶；Medan 品種（系）（代號 21）應用 SSRY12 爲引子組時，於 400 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶。

然而，要針對每一個品種（系）都找到獨特專一的條帶是非常困難的，因此從事較大規模地種原品種（系）鑑定時，常需要用到多個以上的引子組合。

表 2. 樹薯種原之 intra-SSR 多型性片段

Table 2. The intra-SSR polymorphic bands of 21 cassava germplasm accessions

Primer	Product size (bp)	Variety/line [z]																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
SSRY 9	286	- [y]	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	271	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
SSRY11	1314	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	1201	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	298	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	276	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
SSRY12	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	302	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSRY25	303	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
	284	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
SSRY49	341	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	309	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	272	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
SSRY68	325	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	302	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	291	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	272	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	259	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
SSRY75	289	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	271	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
SSRY76	305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	285	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	272	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
	259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SSRY91	340	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
SSRY93	326	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	306	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	290	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
	272	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
SSRY106	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[y] +:band is present ; -:band is absent.

[z] Label of variety/line see as Table 1.

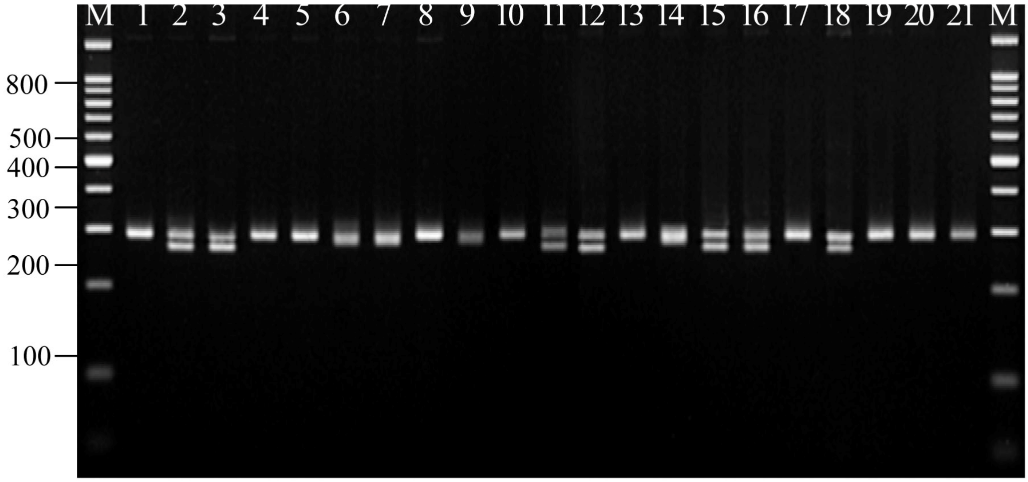


圖 2. 21 個樹薯種原之 intra-SSR 瓊膠電泳圖。

Fig. 2. The intra-SSR electrophoretic profiles on agarose for 21 cassava germplasm accessions. (M:100 bp marker; 1-21: Label of variety/line was described in Table 1.)

就本研究樹薯品種（系）的鑑定而言，首先以最簡單的兩個引子組合爲例：台南育 1 號（代號 1）應用 SSRY68 爲引子組，藉由 302 bp 位置的專一性條帶，已經可與其它 20 個樹薯品種（系）中的 19 個品種（系）進行區別，僅無法與 Hicran（代號 11）區別。但由上述討論，我們已經瞭解 Hicran 品種（系）應用 SSRY12 爲引子組時，於 255 bp 位置處具有其專屬的特殊專一性條帶。因此綜合 SSRY68 及 SSRY12 兩個引子組，台南育 1 號與其它 20 個樹薯品種（系）便可以完全地區分。

以上同樣的品種（系）鑑定原理可運用在台南育 7 號。台南育 7 號（代號 7）應用 SSRY93 爲引子組，藉由 306 bp 位置的專一性條帶，已經可與其它 20 個樹薯品種（系）中的 19 個品種（系）進行區別，僅無法與 Lunclnan（代號 13）區別。但由上述討論，我們已經瞭解 Lunclnan 品種（系）應用 SSRY76 爲引子組時，於 259 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶。因此綜合 SSRY93 及 SSRY76 兩個引子組，台南育 7 號與其它 20 個樹薯品種（系）便可以完全地區分。

至於台南育 6 號（代號 6），雖然也只用到了兩個引子組合，但鑑定判別的情形則較爲複雜：台南育 6 號應用 SSRY11 爲引子組時，藉由 298 bp 位置的專一性條帶，已經可與其它 18 個品種（系）進行區別，但無法與 Lunclnan（代號 13）、Bitter（代號 14）區別。由於 Lunclnan 品種（系）應用 SSRY76 爲引子組時，於 259 bp 位置處具有專屬的特殊專一性條帶。因此目前只剩 Bitter（代號 14）無法與台南育 6 號作區別，當我們回頭再次檢視表 2 的研究結果，發現在應用 SSRY11 爲引子組的同時，Bitter（代號 14）於 1,314 bp 與 276 bp 處亦具有條帶，而台南育 6 號則無條帶。綜合上述，台南育 6 號樹薯品種（系）能夠與其它 20 個樹薯品種（系）達到完全地區分，雖然也只用到了兩個引子組合（SSRY11 及 SSRY76），但鑑定的判別區域卻跨越了四個條帶位置，即 SSRY11 引子組的 1,314 bp、298 bp、276 bp 與 SSRY76 引子組的 259 bp 位置，所以鑑定判別情形較爲複雜。

本研究中發現 SSRY11 是一個很有效率的引子組。就上述之鑑定過程，換個角度以 Bitter（代號 14）爲主角來看，其實也是判別 Bitter（代號 14）可與其它 20 個樹薯品種（系）達到完全地區

分之鑑定過程。除此之外，繼續將上述 SSRY11 為引子組之鑑定研究結果延伸，其 276 bp 位置只有 Hicran（代號 11）、Bitter（代號 14）及 Chirgwi（代號 15）。由於 Hicran 品種（系）應用 SSRY12 為引子組時，於 255 bp 位置處具有其專屬的特殊專一性條帶。而且 SSRY11 引子組的 298 bp 位置，Chirgwi（代號 15）無條帶，而 Bitter（代號 14）有條帶，於是又可多區分出一個品種（系）Chirgwi（代號 15）。

在進行種原鑑定時，我們期望可以最少的引子數目，達成最大的鑑定效率。因此，截至目前為止，已可將九個品種（系）單獨由全部 21 個品種（系）中鑑別出來，所利用到引子組合只有 6 個：SSRY11、SSRY12、SSRY49、SSRY68、SSRY76、SSRY93。

餘此類推，經由 11 組引子對所產生的 32 條 DNA 逢機增幅片段可將 21 個樹薯品種（系）一一區分出來。

討　論

鑑別種原最簡單、直接的方式是由外觀性狀來判別，本研究首先嘗試以樹薯的葉、葉脈、葉柄的顏色，以及葉片的長／寬比、莖圍、分支數與株高等性狀，進行初步的品種（系）鑑定。結果顯示各品種（系）間在葉脈色、葉柄色這兩個項目雖具有較明顯可辨別的差異，但仍無法用以區分 21 個樹薯種原。此外，部份數量性狀，如莖圍、分支數、株高等，除了受基因影響之外，栽培環境也可能引起性狀表現差異，故數量性狀調查，必須在同一栽培環境下所獲資料，才能進行品種鑑定。

DNA 層次的分子標誌由於不受環境影響，且可使用的標誌位置數目多，因此一般被認為是進行種原鑑定的良好工具。在本研究中，我們使用了 RAPD 與 intra-SSR 兩種分子標誌，結果發現 RAPD 雖然可以產生較多的多型性條帶，但要作到將 21 個樹薯種原進行完全的區別卻很困難；相對的，以 11 組 intra-SSR 引子進行試驗，雖僅可獲得 32 條多型性片段，但經由這些多型性片段的組合，卻可成功地將 21 個樹薯品種（系）進行完全的區分。探究其原因，造成此結果的主要原因為 RAPD 所使用的引子是逢機的序列，分散在植物體基因組中。但是 intra-SSR 的序列基礎是相同的，只是遺傳機制上這些 DNA 重複序列的數目，在不同品種（系）間有差異。因此本研究的經驗，充分顯示 intra-SSR 分子標誌在樹薯種原鑑定，為一強而有力之工具。

但就探討種原遺傳歧異的觀點而言，本研究採取 RAPD 結果進行群集分析，因為 RAPD 可產生的多型性高，對於廣泛探討基因組之間的遺傳變異與親緣關係，會較為適切。本試驗之 RAPD 結果，呈現出各樹薯品種（系）間的遺傳距離，有助於育種親本之選擇，與雜交工作之進行，可加速優良雜交後裔之獲得，對於提昇樹薯之育種效率，具有實用之價值。

經由以上述結果可知，SSR 分析所偵測的目標序列之保守性較高，且通常非功能性基因，所以不僅序列的重複性高，此序列也不易受環境影響而改變，因此分析結果較穩定，所以利用 SSR 之引子組，進行 PCR 反應，其所增幅之條帶通常比 RAPD 單純，且再現性高，可以彌補 RAPD 再現性差之缺點，因此 SSR 是重要的品種鑑別工具之一。

誌　謝

本試驗樹薯種原材料承蒙前台東區農業改良場作物改良課前研究員兼課長李興進(已退休)提供，特此感謝。本研究承農委會計畫經費支持，特申謝忱。

引用文獻 (Literature Cited)

Beeching, J. R., P. Marmey, M. C. Gavalda, M. Noirot, H. R. Haysom, M. A. Hughes, and A. Charrier. 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. Ann. Bot. 72:515-520.

Chavarriaga-Aguirre, P., M. M. Maya, M. W. Bonierbale, S. Kresovich, M. A. Fregene, J. Tohme, and G. Kochert. 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crants):discovery, inheritance and variability. Theor. Appl. Genet. 97:493-501.

Chavarriaga-Aguirre, P., M. M. Maya, J. Tohme, M. C. Duque, C. Iglesias, M. W. Bonierbale, S. Kresovich, and G. Kochert. 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. Mol. Breed. 5:263-273.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Elias, M., O. Panaud, and T. Robert. 2000. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. Heredity 85:219-230.

FAO and IFAD. 2000. Cassava medium-term outlook. *in*: The World Cassava Economy: Facts, Trends and Outlook. FAO and IFAD press, Rome.

Fregene, M. A., J. Vargas, F. Angel, J. Thome, R. A. Asiedu, M. O. Akorada, and W. M. Roca. 1994. Chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA variability in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. Theor. Appl. Genet. 89:719-727.

Hussain, A., W. Bushuk, H. Ramirez, and W. M. Roca. 1987. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozyme. Seed Sci. Tech. 15:19-22.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florate. Bull. Soc. Vaudoise Sa. Not. 44:223-270.

Lefevre, F., and A. Charrier. 1993. Heredity of seventeen isozyme oci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Euphytica 66:171-178.

Lin, C. Y. 2007. Prospects of the international promotion for bio-energy crop. Forestry Research Newsletter 14(3):35-40.

Litt, M., and J. A. Lutty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44:397-401.

Marmey, P., J. R. Beeching, S. Hamon, and A. Charrier. 1994. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD makers. Euphytica 74:203-209.

Oard, J. H., and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random primer PCR. Plant Mol. Biol. Rep. 10:236-241.

Ramirez, H., A. Hussain, W. M. Roca, and W. Bushiuk. 1987. Isozyme electro-phenograms of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varities. Euphytica 36:39-48.

Roa, A. C., M. M. Maya, M. C, Duque, J. Tohme, A. C. Allem, and M. W. Bonierbale. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. Theor. Appl. Genet. 95:741-750.

Roa, A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. W. Bonierbale. C. Iglesias, and J. Tohme. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) Microsatellites:allelic polymorphism and degree of relationship. Am. J. Bot. 87:1647-1655.

Wong, H. L., H. H. Yeoh, S. H. Lim, and K. C. L. Looi. 1997. Design of primers for RAPD analyses of cassava, *Manihot esculenta*. Phytochemistry 46:805-810.

Wong, H. L., H. H. Yeoh, and S. H. Lim. 1998. Customisation of AFLP analysis for cassava varietal identification. Phytochemistry 50:919-924.

Genetic Diversity and Identification of Cassava Germplasm with RAPD and SSR[1]

Shu Chen[2,4], Chung-Chen Fan[3] and Chien-Yih Lin[2]

Abstract

Chen, S., C. C. Fan, and C. Y. Lin. 2007. Genetic diversity and identification of cassava germplasm with RAPD and SSR. J. Taiwan Agric. Res. 56:327-337.

The research aimed to identify 21 cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm accessions collected from Taiwan. The objectives were to understand genetic diversity among cassava germplasm accessions using RAPD and to identify each of them by intra-SSR. 21 accessions of cassava germplasm were clustered to 4 groups based on 156 polymorphic bands of RAPD. From the analysis of RAPD, it could provide as references for breeders, 32 polymorphic bands from 11 SSR primers were found and the 21 cassava varieties / lines could be differentiated completely using these intra-SSR polymorphic bands. This research revealed that the intra-SSR is a powerful molecular tool for the identification of cassava germplasm.

Key words: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Genetic diversity, Germplasm, Identification, RAPD, SSR.

1. Contribution No.2306 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 15, 2007.
2. Assistance Researcher, Plant Germplasm Division, ARI; Director-general, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail:cshu@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23331673.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 56(4):338-341 (2007)

山櫻花之新變型[1]

溫英杰[2,3]

摘　　要

溫英杰。2007。山櫻花之新變型。台灣農業研究 56:338-341。

山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 亦稱緋寒櫻，文獻上以往只有深紅花色的記載，本文報導之白花山櫻 (*Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen) 與山櫻花植物特徵相似，花朵同為懸垂鐘狀漏斗型，主要差別在於白花山櫻之花瓣為白色、花萼及成熟果實為黃色。本變型除了可供園藝觀賞及景觀美化之用外，更是育成新櫻花品種的重要種原。

關鍵詞：山櫻花、變型、種原。

山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 亦稱緋寒櫻，是已知世界上需冷性最少、花色最為濃艷的櫻花品種，花朵濃紅色、單瓣、吊鐘型，花冠筒中含蜜汁，果實成熟時呈艷紅色，是訪花昆蟲及鳥類的重要食物來源，對環境、土壤的適應性強。本種分布中國大陸南部、台灣、琉球及日本等，台灣主要分布於 500-2,000 m 的闊葉樹林中。台灣植物誌 (Huang 1993) 及台灣樹木誌 (Liu *et al.* 1994) 對山櫻花的顏色皆只有紅色花而無其他花色之記載。本文描述一種採集自八通關地區之山櫻花新變型，經嫁接繁殖和多年適應性觀察後，確定其性狀穩定，將之發表為新變型，並描述其性狀，以供後續應用。

***Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen 白花山櫻（圖 1）**

Prunus campanulata Maxim. *similes*, *sed receptaculum et fructus flavus, petala albus differt.*

Deciduous tree, up to 10 m high. Leaves ovate to obovate-elliptic, 6-11 cm long, 5-8 cm wide, acuminate at apex, rounded at base, closely double-serrate, glabrous, the lateral veins 8-10 per side, indistinct above, raised and conspicuous beneath. Flowers pendulous, few-corymbose, the pedicels slender, 1.2-1.7 cm long, glandular, calyx-tube yellow, 1 cm long, campanulate, the lobes triangular-ovate, obtuse to rounded; petals ovate, white, 1.0-1.2 cm long, 0.8-0.9 cm wide, emarginate, stamen, 32-37, anther, yellow. Fruits ovoid, about 1.2 cm long, yellow. Standard: *S125633* (NMNS, National Museum of Natural Science) specimen prepared from a 10-years old plant cultivated in Rona repository.

註：本變型採自八通關（海拔 2,800 m），經嫁接繁殖，性狀穩定，在海拔 1,000 m 及 400 m 地方種植皆生長良好 (圖 2、3)。與山櫻花（*Prunus campanulata* Maxim.又稱緋寒櫻）主要差別在於花瓣為白色、花萼黃色及果實成熟時為黃色。

白花山櫻在高海拔地區發現，文獻上並無此種花色之記載，在台灣各觀光地區所植數十萬株的台灣山櫻實生苗中，亦未見分離出白色花，一度懷疑其為外來品種，但查閱日本有關櫻花品種之書

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2308 號。接受日期：96 年 10 月 23 日。
2. 本所作物種原組副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：icwen@wufeng.tari.gov.tw；傳真：(04)23390791。

圖 1. 白花山櫻花朵形態。
Fig. 1. Flowers of *Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen.

圖 2. 白花山櫻在羅娜保存園（海拔 1,000 m）開花情形。
Fig. 2. *Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen grows on Rona repository (1,000 m elevation).

籍亦無此類品種之記載 (Kawasaki 1984)，經 RAPD 親緣關係分析結果，山櫻花與白花山櫻自成一亞群，證實其爲台灣山櫻花族群的一個成員 (Wen & Chang 2005)，因此依據國際栽培植物命名法規 (Brickell *et al.* 2004)，將之命名爲白花山櫻。此一變型之發現可以增加台灣櫻花花色之多樣性，在遺傳育種上，更是育成新花色如淡紅、粉紅、淡粉、白粉之櫻花品系不可或缺的親本。白花山櫻雖然採集自高海拔地區，但其嫁接苗在海拔 1,000 m 的羅娜及 400 m 的豐原皆能正常生育，且物候期與開紅花的台灣山櫻相近，證明其具有廣泛之風土適應性，而且開花量大，爲珍貴的原生美化樹種，這個特性未見於霧社櫻 (*Prunus taiwaniana* Hayata)、阿里山櫻 (*Prunus transarisanensis* Hayata) 等其他台灣原生櫻花種類。

圖 3. 白花山櫻在豐原地區（海拔 400 m）開花情形。
Fig. 3. *Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen grows on Fengyen area (400 m elevation).

誌 謝

標本承蒙國立自然科學博物館嚴新富組長協助製作，謹致謝忱。

引用文獻 (Literature cited)

Brickell, C. D., B. R. Baum, W. L. A. Hetterscheid, A. C. Leslie, J. McNeill, P. Trehane, F. Vrugtman, and J. H. Wiersema. (eds) 2004. International Code of Nomenclature for Cultivated Plants. International Society for Horticultural Science. Leuven. 123 pp.

Huang, T. C. 1993. Flora of Taiwan. vol. III. second edition. National Taiwan University. Taipei. 1084 pp.

Kawasaki, T. 1984. Classification of Japanese cherry trees. p.1-26. *in*: Manual of Japanese Flowering Cherry (Honda, M. eds). Companion of Flower Association of Japan. Tokyo. (in Japanese)

Liu, Y. C., F. Y. Lu, and C. H. Ou. 1994. Trees of Taiwan. National Chung-Hsing University, Taichung. 925 pp. (in Chinese).

Wen, I. C., and C. Y. Chang. 2005. Evaluation and genetic relationship analysis using RAPD on flowering cherry germplasm. J. Taiwan Agric. Res. 54:245-256. (in Chinese with English abstract)

New Forma of *Prunus campanulata* Maxim.[1]

Ien-chie Wen[2,3]

Abstract

Wen, I. C. 2007. New forma of *Prunus campanulata* Maxim. J. Taiwan. Agric. Res. 56:338-341.

In the literature, *Prunus campanulata* Maxim. only have deep red flower record. This article describes the characteristic of white flower forma of *Prunus campanulata*. *Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen is similar with *Prunus companulata* Maxim. The main difference between them is *Prunus campanulata* Maxim. F. *Alba* I. C. Wen having white petals and yellow calyx and fruit. The new forma, besides landscape using, is an important germplasm for breeding new flowering cherry.

Key words: *Prunus campanulata*, Forma, Germplasm.

---

1. Contribution No.2308 from Agricultural Research Institute,Council of Agriculture. Accepted: October 23, 2007.
2. Associate Researcher, Plant Germplasm Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding author, e-mail:icwen@wufeng.tari.gov.tw; Fax:(04)23331673.

台灣農業研究

第五十六卷 目 次

第一期

研究報告

謝麗娟、張義璋、謝廷芳——水稻品種對淡黃化型白葉枯病之抗感病性 1
陸明德、宋家瑋、歐錫坤——Aminoethoxyvinylglycine 處理部位對‘台農甜蜜’桃成熟期、採收前落果及果實品質之影響 11
陳威臣、曹進義、夏奇鈮——丹參組織培養苗馴化處理及其植株丹參酮含量分析 21
姚銘輝、陳守泓、漆匡時——氣候變遷下水稻氣象資源利用效率之研究 31
陳烈夫、曾文彬、魏夢麗、呂秀英——植酸酵素基因轉殖之馬鈴薯植株生長和產量評估 45
陳威臣、蕭翌柱、蔡新聲、夏奇鈮——植物生長調節劑與光照處理對延胡索癒合組織增生與小塊莖形成之影響 53

第二期

研究報告

劉滄棽、郭鴻裕、朱戩良、連深——台灣東部蛇紋岩母質化育土壤地區重金屬特性之初探 65
賴明信、李長沛、曾清山、顏信沐、卓緯玄、曾東海、陳治官——稉型稻新品種台農 75 號的育成 79
倪蕙芳、許淑麗、楊宏仁——山藥根腐線蟲不同接種方法之評估 99
王昭月、宋家瑋、劉明穗、歐錫坤——微衛星 DNA 分子標誌應用於桃栽培種與雜交後代之遺傳相似性分析 107
吳永培、柯佩怡、曾東海、王強生——水稻香味及米粒品質突變體之篩選 121
楊世華、潘德芳——台灣鳳梨農場生產效率之分析 134
楊淑惠、楊鎮榮、陳宜嫺——銀耳多醣應用爲皮膚保養原料之活體外及活體內評估 143

第三期

研究報告

江明耀、高靜華、黃毓斌、鄭允、李木川——東方果實蠅小面積區域防治模式研究（一）
蓮霧園之測試 153
高瑞隆、余志儒、陳琦玲、李豔琪、謝廷芳、胡敏夫——肥培管理對薑黃產量及
薑黃素含量之影響 165
陳哲仁、楊金興、曾東海、鄭統隆、吳明哲——利用微衛星序列作爲台灣落花生栽培種
DNA 分子標誌 176
蔡淑珍、吳宗諺、楊金興、劉慧瑛、廖慶樑——蒸煮方式和乾燥復水對落花生果實化學成分
及質地之影響 189
黃肇家、黃慧穗、蔡金玉、張素貞——氣調貯藏對高熟度採收高接‘新興’梨貯藏品質之影響 206
邱輝龍、李淑英、葉慶龍、許圳塗、葉川榮——拔蕉 (*Musa balbisiana* L. A. Colla)，
台灣新歸化野生香蕉 215
姚銘輝、陳守泓、漆匡時——利用葉綠素螢光估算作物葉片之光合作用 224
張耿衡、蔡隆禾、吳容儀、戴廷恩、謝廷芳——樹皮作爲蝴蝶蘭栽培介質之評估 237

第四期

研究報告

謝麗娟、張義璋、陳純葳、謝廷芳——利用水稻稻熱病之罹病葉保存稻熱病菌 253
呂秀英`邱怡嘉、陳政道、魏夢麗、呂椿棠——受稻熱病菌誘導之水稻表現序列標幟 (EST)
的比較分析 261
李文立、鄧永興、林榮貴——應用 RAPD 技術對荔枝品種遺傳變異性之研究 281
宋家瑋、陸明德、歐錫坤——台灣原生山櫻花 (*Prunus campanulata* Maxim.) 大果種原之選拔 289
黃阿賢、洪士程——砧木種類對茂谷柑植株生長、產量與品質的影響 298
黃晉興、王毓華——台灣甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 的生理小種 307
陳錦桐、李瑋崧、吳寬澤——不同栽培基質與覆土材料對雞腿蘑出菇特性之影響 316
陳逑、范宗宸、林俊義——以 RAPD 及 SSR 分子標誌進行樹薯種原遺傳歧異分析及種原鑑定 327

研究簡報

溫英杰——山櫻花之新變型 338
第五十六卷總目錄 342
第五十六卷索引 346

JOURNAL OF
TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Contents of volume 56

Number 1
Research Reports

Lih-Jiuan Hsieh, Yih-Chang Chang and Ting-Fang Hsieh——Susceptibility of Rice Varieties to Pale-Yellow-Leaf Type of Bacterial Leaf Blight Caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* 1

Ming-Te Lu, Chia-Wei Song and Shyi-Kuan Ou——Effect of Different Spraying Treatments of Aminoethoxyvinylglycine (AVG) on Maturation, Preharvest Drop, and Fruit Quality of 'Premier' Peach 11

Uei-Chern Chen, Chin-Yi Tsao and Chi-Ni Hsia——*In Vitro* Plantlets Acclimation and Tanshinones Analysis of *Salvia Miltiorrhiza* 21

Ming-Hwi Yao, Shou-Hung Chen and Kung-Shy Chi——Studies on the Meteorological Resources Use Efficiency of Rice for Climate Change 31

Lit-Fu Chan, Wen-Pin Tseng, Meng-Li Wei and Hsiu-Ying Lu——Plant Growth and Yield Evaluation of Phytase Transgenic Potato 45

Uei-Chern Chen, Yih-Juh Shiau, Hsin-Sheng Tsay and Chi-Ni Hsia——Effects of Plant Growth Regulator and Light Treatment on Callus Proliferation and *In Vitro* Mini-tuber Formation of *Corydalis yanhusuo* 53

Number 2
Research Reports

Tsang-Sen Liu, Horng-Yuh Guo, Jiang-Liung Chu and Shen Lian ——Preliminary Study on Heavy Metal Characteristics in Serpentinite-developed Soil Regions in Eastern Taiwan 65

Ming-Hsin Lai, Charng-Pei Li, Ching-Shan Tseng, Hsin-Mu Yen ,Woei-shyuan Jwo, Tung-Hai Tseng and Chyr-Guan Chern——Tainung rice No.75: a New Japonica Type Rice Variety 79

Hui-Fang Ni, Shu-Li Hsu and Hong-Ren Yang——Evaluation of Different Method for Inoculation of *Pratylenchus Coffeae* on Yam 99

Jau-Yeuh Wang, Chia-Wei Song, Min-Huai Liou and Shyi-Kuan Ou——Analysis of Genetic Similarity in Selected Peach Cultivars and Their Hybrids by Microsatellite DNA Markers .. 107

Yong-Pei Wu, Pei-Yi Ko, Tung-Hai Tseng and Chang-Sheng Wang——Screening for Scent and Grain Quality in Rice Mutants 121

Shi-Hua Yang and Te-Fang Pan——An Analysis on the Production Efficiency of Pineapple Farms in Taiwan 134

Shu-Hui Yang, Jenn- Rong Yang and Yi-Shyan Chen—— *In Vitro* and *in Vivo* Evaluations of *Tremella* Polysaccharides for Skin Care 143

Number 3
Research Reports

Ming-Yao Chiang, Ching-Hua Kao, Yu-Bing Huang, Edward Y. Cheng and Mu-Chuan Lee——Studies on Small Model Area-wide Control of the Oriental Fruit Fly for Wax Apple in Taiwan 153

Ruei-Lung Kao, Jih-Zu Yu, Chi-Ling Chen, Yahn-Chir Lee, Chien-Liang Chu, Ting-Fang Hsieh and Min-Fu Hu——Effect of Fertilizer Treatments on Rhizome Yield and Curcumin Content of Turmeric 165

Jen-Ren Chen, King-Hsing Yang, Tung-Hai Tseng, Toong-Long Jeng, and Min-Tze Wu—Microsatellites as DNA Markers in Taiwan Cultivated Peanut 176

Shwu-Jene Tsai, Tsung-Yen Wu, King-Hsing Yang, Huey-Ing Liu and Ching-Liang Liaw—Effects of Cooking Methods and Rehydration on the Chemical Composition and Texture of Peanut 189

Chao-Chia Huang, Huei-Suei Huang, Chin-Yu Tsai and Su-Jein Chang——The Effect of Controlled Atmosphere Storage on the Quality of Late Harvest Annual-Grafting 'Shinko' Pear Fruits 206

Hui-Lung Chiu, Shu-Inn Lee, Ching-Long Yeh, Chou-Tou Shii, and Chuan-Rong Yeh——*Musa balbisiana* L. A. Colla, A Newly Naturalized Wild Banana in Taiwan 215

Ming-Hwi Yao, Shou-Hung Chen and Kung-Shy Chi——Use of Chlorophyll Fluorescence for Estimating Leaf Photosynthesis of Crops 224

Keng-Heng Chang, Long-Ho Tsai, Rung-Yi Wu, Ting-En Dai and Ting-Fang Hsieh——Evaluation of Bark as a Growth Medium for Cultivation of *Phalaenopsis* orchids 237

Number 4
Research Reports

Lih-Jiuan Hsieh, Yih-Chang Chang, Chun-Wei Chen and Ting-Fang Hsieh——Use of Rice Blast Diseased Leaves for Preservation of *Pyricularia oryzae* 253

Hsiu-Ying Lu, Yi-Chia Chiu, Cheng-Tao Chen, Meng-Li Wei and Chun-Tang Lu—Comparative Analysis of Expressed Sequence Tag (EST) in Rice Induced by *Magnaporthe grisea* 261

Wen Li Lee, Yung Shing Teng and Rong Quey Lin——Using RAPD Markers to Study Genetic Variation Among Lychee Cultivars 281

Chia-Wei Song, Ming-Te Lu and Shyi-Kuan Ou——Selection for Large Fruit of *Prunus campanulata* Maxim. Germplasm in Taiwan 289

A-Shiarn Hwang and Shih-Cheng Hung——Effects of Rootstocks on Tree Growth, Yield and Fruit Quality of 'Murcott' Tangor 298

Jin-Hsing Huang and Yu-Hwa Wang——The Races of *Podosphaera xanthii* Causing Melon Powdery Mildew in Taiwan 307

Jin-Tong Chen, Wei-Sung Li and Kaun-Tzer Wu——Effects of Culture Media and Casing Materials on Fruiting Characteristics of *Coprinus comatus* 316

Shu Chen, Chung-Chen Fan and Chien-Yih Lin——Genetic Diversity and Identification of Cassava Germplasm with RAPD and SSR 327

Research Notes

Ien-chie Wen——New Forma of *Prunus campanulata* Maxim. 338

Contents of Volume 56 342

English Index of Volume 56 346

台灣農業研究第56卷索引

三劃

土壤，蛇紋石化育，重金屬特性，台灣東部 65

山藥，根腐線蟲，接種方法 99

山櫻花

－大果種原選拔 289

－變型，種原 338

四劃

王昭月 107

王強生 121

王毓華 307

丹參，藥用植物，微體繁殖生產丹參酮 21

丹參酮，丹參二次代謝物，微體繁殖生產 21

分子標誌，落花生栽培種，簡單重複序列 176

分子鑑定

－荔枝，遺傳變異，RAPD 技術 281

－落花生，栽培種分子標誌，簡單重複序列 176

木屑，雞腿蘑出菇 316

水分利用效率，水稻，氣候變遷 31

水苔，蝴蝶蘭栽培介質 237

水稻

－白葉枯病，淡黃化型，稻品種，抗感病性 1

－氣候變遷，輻射與水分利用效率 31

－新品種，台農 75 號，疊氮化鈉誘變 79

－誘變育種，香味與優質米質突變體，EMS 誘變 121

－稻熱病，稻熱病菌，罹病葉保存法，接種源 253

－稻熱病菌誘導表現序列標幟，功能註解及分類，基因表現量統計分析 261

五劃

生理小種，甜瓜白粉病 307

白粉病，甜瓜，生理小種 307

六劃

朱戩良 65

江明耀 153

光合作用，葉綠素螢光，電子傳遞速率 224

多醣體萃取液，銀耳，皮膚保濕 143

七劃

余志儒 165

吳永培 121

吳宗諺 189

吳明哲 176

吳容儀 237

吳寬澤 316

呂秀英 45, 261

呂椿棠 261

宋家璋 11, 107, 289

李文立 281

李木川 153

李長沛 79

李淑英 215

李瑋崧 316

李豔琪 165

抗感病性，水稻淡黃化型白葉枯病 1

八劃

卓緯玄 79

林俊義 327

林榮貴 281
邱怡嘉 261
邱輝龍 215
延胡索，藥用植物，微體繁殖組織培養，光照影響，塞本隆 (thidiazuron, TDZ) 53
拔蕉，芭蕉，歸化植物，台灣 215
東方果實蠅，區域防治，蓮霧，小面積防治模式 153
芭蕉，拔蕉，歸化植物，台灣 215
花色，山櫻花，變型，種原 338

九劃

姚銘輝 31, 224
柯佩怡 121
洪士程 298
胡敏夫 165
范宗宸 327
倪蕙芳 99
柑橘，茂谷柑，砧木，植株生長，產量，品質 298
茂谷柑，砧木，植株生長，產量，品質 298
美容保養，銀耳多醣體萃取液，皮膚保濕 143
重金屬特性，蛇紋石化育土壤，台灣東部 65
香味水稻，突變體篩選，EMS 誘變 121

十劃

夏奇鋌 21, 53
高瑞隆 165
高靜華 153
根腐線蟲，山藥，接種方法 99
栽培介質
－蝴蝶蘭栽培介質，樹皮，水苔 237
－雞腿蘑，堆肥，木屑，覆土，出菇 316
桃
－台農二號甜蜜桃，採收期，果肉硬度 11
－親緣關係，微衛星 DNA，遺傳相似性，果實特性 107
氣候變遷，水稻，輻射與水分利用效率 31
氣調貯藏，東方梨果實品質 206
病原菌保存，水稻稻熱病，稻熱病菌，罹病葉保存法 253
砧木，茂谷柑植株生長，產量，品質 298
荔枝，遺傳變異，RAPD 技術 281
馬鈴薯，植酸酵素基因轉殖，生長與產量 45

十一劃

張素貞 206
張耿衡 237
張義璋 1, 253
曹進義 21
許圳塗 215
許淑麗 99
連　深 65
郭鴻裕 65
陳守泓 31, 224
陳宜嫻 143
陳治官 79
陳威臣 21, 53
陳政道 261
陳　述 327
陳哲仁 176
陳烈夫 45
陳純葳 253
陳琦玲 165
陳錦桐 316
陸明德 11, 289
堆肥，雞腿蘑出菇 316

基因分析，稻熱病菌誘導水稻表現序列標幟，基因功能表現量統計分析 261
基因轉殖，馬鈴薯轉殖植酸酵素基因，生長與產量 45
採後處理，東方梨氣調貯藏，果實品質 206
梨，氣調貯藏，果實品質 206
甜瓜，白粉病生理小種 307
統計分析，稻熱病菌誘導水稻表現序列標幟，基因功能表現量 261
組織培養
－丹參微體繁殖生產丹參酮 21
－延胡索微體繁殖，光照影響，塞本隆 53
蛇紋石化育土壤，重金屬特性，台灣東部 65
逢機增幅多型性 DNA (RAPD)
－荔枝遺傳變異 281
－樹薯種原遺傳歧異鑑定 327

十二劃

曾文彬 45
曾東海 79,121,176
曾清山 79
黃阿賢 298
黃晉興 307
黃毓斌 153
黃肇家 206
黃慧穗 206
復水，莢果花生，花生仁，化學成分，蒸煮方式 189
植酸酵素基因，馬鈴薯基因轉殖作物，生長與產量 45
菇類，雞腿蘑，堆肥，木屑，覆土，出菇 316

十三劃

楊世華 134
楊宏仁 99
楊金興 176,189
楊淑惠 143
楊鎮榮 143
溫英杰 338
葉川榮 215
廖慶樑 189
葉慶龍 215
滲匡時 31, 224
塞本隆，影響延胡索微體繁殖組織培養 53
微衛星 DNA，桃親緣關係，遺傳相似性，果實特性 107
新品種，水稻台農 75 號，疊氮化鈉誘變 79
落花生
－品種分子標誌，簡單重複序列 176
－莢果，花生仁，化學成分，蒸煮方式，復水 189
葉綠素螢光，光合作用，電子傳遞速率 224
農業經濟，鳳梨生產效率分析，資料包絡分析法，BCC 模式 134

十四劃

種原
－山櫻花，變型 338
－台灣原生山櫻花，大果種 289
－樹薯，利用 RAPD 與 SSR 分析鑑定 327
誘變
－EMS，香味與優質米質突變體 121
－疊氮化鈉，水稻新品種台農 75 號 79
銀耳，多醣體萃取液，皮膚保濕 143
鳳梨，生產效率，資料包絡分析法，BCC 模式 134

十五劃

劉明樬 107
劉滄棽 65
劉慧瑛 189
歐錫坤 11, 107, 289
潘德芳 134
鄭 允 153
鄭統隆 176
鄧永興 281
蔡金玉 206
蔡淑珍 189
蔡隆禾 237
蔡新聲 53
稻熱病
—誘導水稻表現序列標幟，功能註解及分類，基因表現量統計分析 261
—罹病葉保存法，接種源 253
蓮霧，東方果實蠅區域防治，小面積防治模式 153
蝴蝶蘭，樹皮，水苔，澆灌頻率，養液濃度 237
養液，濃度與澆灌頻率，蝴蝶蘭 237

十六劃

賴明信 79
蕭翌柱 53
樹皮，蝴蝶蘭栽培介質 237
樹薯種原鑑定，逢機增幅多型性 DNA (RAPD)，簡單序列重複 327
親緣關係
—桃，微衛星 DNA，遺傳相似性，果實特性 107
—荔枝遺傳變異，逢機增幅多型性 DNA (RAPD) 281
—落花生栽培種分子標誌，簡單重複序列 176
—樹薯種原，逢機增幅多型性 DNA (RAPD)，簡單序列重複 327
輻射利用效率，水稻，氣候變遷 31
遺傳變異
—荔枝，RAPD 技術 281
—樹薯種原，逢機增幅多型性 DNA (RAPD)，簡單序列重複 327
優質農業操作，薑黃，薑黃素生產，肥培管理 165

十七劃

戴廷恩 237
謝廷芳 1, 165, 237, 253
謝麗娟 1, 253
薑黃，薑黃素，優質農業操作，肥培管理 165
歸化植物，拔蕉，台灣 215

十八劃

顏信沐 79
魏夢麗 45, 261
簡單序列重複，樹薯種原遺傳歧異分析 327
蟲害防治，東方果實蠅，蓮霧，小面積防治模式 153
覆土，雞腿蘑出菇 316
雞腿蘑，堆肥，木屑，覆土，出菇 316
藥用作物
—丹參，微體繁殖生產丹參酮 21
—延胡索，微體繁殖組織培養，光照影響，塞本隆 53
—薑黃，薑黃素，優質農業操作，肥培管理 165
櫻花，山櫻花
—大果種原，果實性狀 289
—變型，種原 338
疊氮化鈉，誘變，水稻新品種台農 75 號 79

English Index of Volume 56

Agricultural economics, production efficiency of pineapple, data envelopment analysis (DEA) 134

Aminoethoxyvinylglycine, *Prunus persica*, Tainung No. 2 peach, harvest time, fruit firmness 11

Arachis hypogaea

- in-shell peanut, kernel peanut, chemical composition, cooking methods, rehydration 189
- peanut, molecular marker, microsatellites, simple sequence repeat (SSR) 176

Aromatic rice, mutation, quality 121

Bactrocera dorsalis, area-wide control, wax apple, small acreage model 153

Banana, wild banana, Genetic resource, *Musa balbisiana*, naturalized plant, Taiwan. 215

Bark, *Phalaenopsis,* fertigation frequency, nutrient solution concentration 237

Chan, L. F. 45

Chang, K. H. 237

Chang, S. J. 206

Chang, Y. C. 1, 253

Chen, C. L. 165

Chen, C. T. 261

Chen, C. W. 253

Chen, J. R. 176

Chen, J. T. 316

Chen, S. C. 327

Chen, S. H. 31, 224

Chen, U. C. 21, 53

Chen, Y. S. 143

Cheng, E. Y. 153

Chern, C. G. 79

Chi, K. S. 31, 224

Chiang, M. Y. 153

Chiu, H. L. 215

Chiu, Y. C. 261

Chu, C. L. 165

Chu, J. L. 65

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), genetic diversity, germplasm, identification, RAPD, SSR. 327

Chlorophyll fluorescence, crop, photosynthesis, electron transport chain 224

Citrus, murcott, citrus rootstock, tree growth, yield, fruit quality 298

Climate change, on rice, radiation use efficiency, water use efficiency 31

Compost, effect on *Coprinus comatus*, casing, fruiting 316

Coprinus comatus, compost, sawdust, casing, fruiting 316

Crop, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, electron transport chain 224

Curcuma longa, Turmeric, curcumin production, good agricultural practices (GAP), fertilizer effect 165

Dai, T. E. 237

Danshen, medicinal plant, micropropagation, danshinone content, secondary metabolite 21

Danshinone, production via danshen micropropagation, secondary metabolite 21

Disease resistance, rice bacterial blight, pale-yellow-leaf type, rice varieties, 1

DNA analysis, *Manihot esculenta,* cassava, genetic diversity, germplasm, identification, RAPD, SSR. 327

DNA marker, for analysis of peanut (*Arachis hypogaea*), microsatellites, simple sequence repeat (SSR) 176

Ethylmethane sulfonate (EMS), rice mutation, aroma, quality 121

Fan, C. C. 327

Fertilization, frequency and concentration on *Phalaenopsis* 237

Fertilizer, effect on turmeric production by *Curcuma longa,* Good agricultural practices (GAP) 165

Forma, germplasm, *Prunus companulata*, 338

Fruit tree

- Asian pear, controlled atmosphere storage, fruit quality. 206
- genetic similarity of peach, microsatellite DNA 107
- lychee, genetic variation, RAPD markers 281
- murcott, citrus rootstock, tree growth, yield, fruit quality 298
- *Prunus persica*, Tainong no. 2 peach, aminoethoxyvinylglycine, harvest time, fruit firmness 11
- wax apple, Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, area-wide control, small acreage model 153

Fruit

- melon, powdery mildew, races of *Podosphaera xanthii* 307
- Pineapple, production efficiency, data envelopment analysis (DEA) 134

Guo, H. Y. 65

Genetic analysis

- of rice induced by *Magnaporthe grisea*, rice blast, expressed sequence tag, functional annotation and classification, statistics of gene representation, clustering analysis, correspondence analysis. 261
- Peanut (*Arachis hypogaea*), molecular marker, microsatellites, simple sequence repeat (SSR) 176
- using RAPD Markers, lychee 281

Genetic resource

- cassava (*Manihot esculenta* Crantz), genetic diversity, germplasm, identification, RAPD, SSR 327
- *Musa balbisiana*, wild banana, naturalized plant, Taiwan 215
- *Prunus campanulata*, large fruit selection 289
- *Prunus companulata*, forma 338

Good agricultural practices (GAP), *Curcuma longa,* Turmeric production, fertilizer effect 165

Growth medium

- for *Phalaenopsis,* bark, sphagnum moss, fertigation frequency, nutrient solution concentration 237
- effect on *Coprinus comatus*, compost, sawdust, casing, fruiting 316

Hsia, C. N. 21, 53

Hsieh, L. J. 1, 253

Hsieh, T. F. 1, 165, 237, 253
Hsu, S. L. 99
Hu, M. F. 165
Huang, C. C. 206
Huang, H. S. 206
Huang, J. H. 307
Huang, Y. B. 153
Hung, S. C. 298
Hwang, A. S. 298
Heavy metal, serpentinite-developed soil, eastern Taiwan 65

Insect pest, *Bactrocera dorsalis*, area-wide control, wax apple, small acreage model 153

Jeng, T. L. 176
Jwo, W. S. 79

Kao, C. H. 153
Kao, R. L. 165
Ko, P. Y. 121

Lai, M. H. 79
Lee, M. C. 153
Lee, S. I. 215
Lee, W. L. 281
Lee, Y. C. 165
Li, C. P. 79
Li, W. S. 316
Lian, S. 65
Liaw, C. L. 189
Lin, C. Y. 327
Lin, R. Q. 281
Liou, M. H. 107
Liu, H. I. 189
Liu, T. S. 65
Lu, C. T. 261
Lu, H. Y. 45, 261
Lu, M. T. 11, 289
Light, on callus micropropagation of yan-hu-suo 53
Lychee, genetic variation, RAPD markers 281

Magnaporthe grisea, inducing rice gene expressing, expressed sequence tag, functional annotation and classification, statistics of gene representation, clustering analysis, correspondence analysis 261
Manihot esculenta, cassava, genetic diversity, germplasm, identification, RAPD, SSR 327
Medicinal herb
- *Curcuma longa,* Turmeric production, good agricultural practices (GAP), fertilizer effect 165
- danshen, micropropagation, danshinone content, secondary metabolite 21
- yan-hu-suo, callus, micropropagation, thidiazuron 53

Melon, powdery mildew, races of *Podosphaera xanthii* 307
Micropropagation, of danshen, danshinone production, secondary metabolite 21
Microsatellite DNA, peach, genetic similarity, fruit characteristics 107
Microsatellites, molecular marker for analysis of peanut (*Arachis hypogaea*), simple sequence repeat (SSR) 176
Murcott, citrus rootstock, tree growth, yield, fruit quality 298

Musa balbisiana, wild banana, Genetic resource, naturalized plant, Taiwan. 215

Mushroom

- *Coprinus comatus*, compost, sawdust, casing, fruiting 307
- *Tremella fuciformis*, polysaccharides, cells toxicity, moisturizing product 143

Mutants of rice, sodium azide, new variety Tainung No.75, Taikeng No.2 79

Ni, H. F. 99

Nematode, *Partylenchus* coffeae causing root-lesion on yams, inoculation method 99

New variety, rice Tainung No.75 via sodium azide mutation 79

Ou, S. K. 11, 107, 289

Orchid, *Phalaenopsis,* effect of sphagnum moss, bark and fertigation frequency and concentration 237

Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, area-wide control, wax apple, small acreage model 153

Pan, T. F. 134

Partylenchus coffeae, root-lesion nematode, yams, inoculation method, 99

Peach

- microsatellite DNA, genetic similarity, fruit characteristics 107
- Tainung No.2, *Prunus persica*, aminoethoxyvinylglycine, harvest time, fruit firmness 11

Peanut (*Arachis hypogaea*)

- molecular marker, microsatellites, simple sequence repeat (SSR) 176
- chemical composition of in-shell and kernel peanut, cooking methods, rehydration 189

Pear, Asian pear, controlled atmosphere storage, fruit quality. 206

Pest control, area-wide control of Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, for wax apple, small acreage model 153

Phalaenopsis, effect of sphagnum moss, bark and fertigation frequency and concentration 237

Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, electron transport chain 224

Phylogeny, lychee, using RAPD markers 281

Phylogeny, peach microsatellite DNA, genetic similarity 107

Phytase gene, Transgenic potato, tuber yield, emergence rate 45

Plant disease

- melon powdery mildew, races of *Podosphaera xanthii* 307
- rice blast, *Pyricularia oryzae,* blast-diseased-leaf preservation method,
- root-lesion nematode (*Partylenchus* coffeae) on yams, inoculation method, 99

polysaccharides, *Tremella fuciformis*, cells toxicity, moisturizing product 143

Post harvest treatment, Asian pear, controlled atmosphere storage, fruit quality. 206

Potato, transgenic plant, phytase gene, tuber yield, emergence rate 45

Powdery mildew, of melon, races of *Podosphaera xanthii* 307

Preservation, of *Pyricularia oryzae* by diseased-leaf method, rice blast, 253

Prunus campanulata

- field selection, large fruit selection 289
- forma, germplasm 338

Prunus persica, Tainung No.2 peach, aminoethoxyvinylglycine, harvest time, fruit firmness 11

Pyricularia oryzae, rice blast, blast-diseased-leaf preservation method 253

Races of *Podosphaera xanthii,* melon powdery mildew, 307

Radiation use efficiency, of rice effected by climate change 31

RAPD analysis, *Manihot esculenta,* cassava, genetic diversity, germplasm, identification 327

Rice bacterial blight, pale-yellow-leaf type, rice varieties, disease resistance 1

Rice
- effect by climate change on use efficiency of radiation and water 31
- mutation, aroma, quality 121
- new variety Tainung No.75, sodium azide, mutants, Taikeng No.2 79
- rice blast, expressed sequence tag, functional annotation and classification, statistics of gene representation, clustering analysis, correspondence analysis. 261
- rice blast, *Pyricularia oryzae,* blast-diseased-leaf preservation method 253
- varieties, pale-yellow-leaf of rice bacterial blight, disease resistance 1

Root-lesion nematode (*Partylenchus* coffeae), yams, inoculation method 99

Rootstock, effect on murcott, tree growth, yield, fruit quality 298

Shiau, Y. J. 53

Shii, C. T. 215

Song, C. W. 11, 107, 289

Sawdust, effect on *Coprinus comatus*, casing, fruiting 316

Serpentinite-developed soil, heavy metal, eastern Taiwan. 65

Simple sequence repeat (SSR)
- for genetic analysis of peanut (*Arachis hypogaea*) 176
- *Manihot esculenta,* cassava, genetic diversity, germplasm, identification 327

Skin care, *Tremella fuciformis*, polysaccharides, cells toxicity, moisturizing product 143

Sodium azide, on rice mutation, new variety Tainung No.75, Taikeng No.2 79

Soil, serpentinite-developed, heavy metal, Eastern Taiwan. 65

Sphagnum moss, *Phalaenopsis,* fertigation frequency, nutrient solution concentration 237

Statistics of gene representation, rice induced by *Magnaporthe grisea*, rice blast, expressed sequence tag, functional annotation and classification, clustering analysis, correspondence analysis 261

Tsai, C. Y. 206

Tsai, L. H. 237

Tsai, S. H. 189

Tsao, J. Y. 21

Tsay, H. S. 53

Tseng, C. S. 79

Tseng, T. H. 79, 121,176

Tseng, W. P. 45

Thidiazuron, on callus micropropagation of yan-hu-suo 53

Tissue culture
- production of danshinone via danshen micropropagation 21
- yan-hu-suo, callus, micropropagation, thidiazuron 53

Transgenic plant, potato, Phytase gene, tuber yield, emergence rate 45

Tremella fuciformis, polysaccharides, cells toxicity, moisturizing product 143

Turmeric *(Curcuma longa*), curcumin production, good agricultural practices (GAP), fertilizer effect 165

Upland crop
- *Arachis hypogaea*, chemical composition of in-shell and kernel peanut, cooking methods, rehydration 189
- *A. hypogaea,* peanut, molecular marker, microsatellites, simple sequence repeat (SSR) 176

Wang, C. S. 121

Wang, J. Y. 107

Wang, Y. H. 307

Wei, M. L. 45, 261

Wen, I. C. 338

Wu, K. T. 316

Wu, M. T. 176

Wu, R. Y. 237

Wu, T. Y. 189

Wu, Y. P. 121

Water use efficiency, of rice effected by climate change 31

Wax apple, Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, area-wide control, small acreage model 153

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*, pale-yellow-leaf of rice bacterial blight, rice varieties, disease resistance 1

Yang, H. R. 99

Yang, J. R. 143

Yang, K. H. 176, 189

Yang, S. H. 134

Yang, S. H. 143

Yao, M. H. 31, 224

Yeh, C. L. 215

Yeh, C. R. 215

Yen, H. M. 79

Yu, J. Z. 165

Yung, S. T. 281

Yan-hu-suo, medicinal plant, callus, micropropagation, thidiazuron, light 53

台 灣 農 業 研 究 稿 約

一、本刊爲行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性季刊，刊登農業試驗研究相關之研究稿件：

論　　說：由本所邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論〈可略去〉、誌謝（可略去）、引用文獻等依序撰寫，圖與表附於其後，全文以不超過 10 印刷頁爲原則。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不需分章節撰寫，但需附中英文摘要，全文以不超過 4 印刷頁爲原則。

二、稿件應以中文或英文撰寫。來稿請送原稿及電子檔案各一份〈內各附照片原圖，繪製圖版可附原圖與影印圖片二份〉。文稿以 A4 大小之白色紙張（長 29.6 公分，寬 21 公分）兩倍行高 (double space) 打字，12 號字體，左邊對齊，版面應上下預留 3 公分，左右 2 公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以 Times New Roman 字體打字；英文字距一格，句距二格。審查接受之稿件，隨文請附紙本文稿一份與電子檔案，以利電腦排版等作業。

三、稿件格式：

題　　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) 。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。題目附小註，說明研究報告編號。

作　　者：作者姓名置中，中文名字間空一格；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以“，”相隔，最後一人前加“and”字樣，其表示方法如 Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen and Chyr-Guan Chen。每一作者需附小註，以說明所屬機關單位，通訊作者須附電子郵件信箱與傳真機號碼。題目與作者同置第一頁。

摘　　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、卷期及頁數，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過五個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過五百字爲原則。以中〈英〉文發表者須附英〈中〉文摘要，置於本文之後，且內容須與中〈英〉文摘要相符，並附稿件編號、作者、通訊作者之小註。

本　　文：依序爲前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論(DISCUSSION)、結論(CONCLUSION)、誌謝(ACKNOWLEDGEMENTS)、引用文獻 (LITERATURE CITED)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，須使用英（外）文以助明瞭時，須將英（外）文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部份如有必要須分章節，每一章節內並可再分小章節，以助明瞭文稿內容。章節題目 (heading) 單行置於該章節之前，小章節題目 (subheading) 直接置於小章節之首。

表　　格：

1、每一表格應分別繕製，須以 word 中“表格”工具製作，上方須有標題，並按文中出現順序加上表 1 (Table 1.)，表 2 (Table 2.) 等冠號。

2、中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。

3、表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照。

4、表中內容如需說明，均須附加小註，以 z, y, x,…等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。

5、性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　片：

1、圖版以黑色墨水分別繪圖紙或描繪紙（白色透明紙）上。如以電腦繪圖，請以鐳射印表機或同規格之印表機列印，力求清晰。

2、圖中加註者，應於圖中說明，或以括號註明於標題之後。

3、照片以光面紙爲原則，清晰度以縮小 50%可判讀爲宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面 (25 cm × 18 cm) 爲宜。

4、圖版及照片下方應有標題（或另頁繕寫），並按文中出現的順序加上圖 1 (Fig.1)、圖 2 (Fig.2) 等冠號，

5、在文中須標示清楚，以便對照。中文稿應中英文併寫，力求明確。

6、除併圖外，每一圖片應單頁製作。

7、照片、圖片背面應註上冠號及作者姓名，以免排印錯誤。

誌　謝：不分段落，包括人物、經費來源等。誌謝可略去。

引用文獻：

1、引用文獻 (Literature cited) 一列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之 文章及學位論文爲限。文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如 (Sung 1991)、(Lo 1991，1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al*. 1992) ，置於引用文處。

2、文獻須以英文撰寫，以姓名字母爲序。作者相同時以年代先後爲序。

3、文獻之書寫方法以期刊爲例，依序爲作者、年代、題目、期刊、卷期、頁數。

4、期刊名須用縮寫，縮寫方式參照美國出版之 “Serial Sources for the BIOSIS Previews Database” 規定。

5、文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34-43. (in Chinese with English abstract).

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press, Taipei. 100 pp. (in Chinese).

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1-12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Agric. Res. Inst. Pub. Taichung. (in Chinese with English abstract).

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passionfruit in Taiwan. p.31-38. *in* the Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. (in Chinese with English abstract).

四、單位、縮寫格式、括號及統計分析

1. 所有度量衡均採公制，數量如用中〈英〉文數字，單位以中〈英〉文全名表示；數量如用阿拉伯數字，單位以 SI units 爲準，如一公尺 (one meter, 1 m) 、二公克(two grams, 2 g) 、三公升 (three liters, 3 L) 、四毫升 (four milliliters, 4 mL) 。各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1)長度：公里 (km)、公尺 (m)、公分〈=厘米〉(cm)、公釐〈=毫米〉(mm)、微米 (μm)。

(2)重量 (W)：公斤 (kg)、公克 (g)、μg。

(3)容積 (V)：公升 (L)、公撮〈=毫升〉(mL)、μl。

2. 溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明) 。
3. 時間：年 (yr)、月 (mo)、週 (wk)、日〈天〉(day, days)、時 (hr)、分 (min)、秒 (sec)。
4. 濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN) 。
5. 重力加速度：*g*。
6. 其他之縮寫：平均 (*av*)、大約 (*ca*)、直徑 (diam.)。
7. 括號：括號內文為西文者，使用半形括號 ( )，括號前後各空一格；括號內文為中文或日文者，使用全形括號（ ），前後不空格。
8. 統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以 a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值 *P*〈例如 *P*<0.01〉；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (*r*) 、決定係數 (R)、變異係數 (cv)、標準機差 (se) 等。

五、生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如 *Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如 *C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者。

六、稿件內容務須依照上列規定格式書寫，本期刊編輯委員保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，作者得送含文稿內容之磁片或電子檔案 (IBM 相容電腦之文書管理檔，如 Word 檔或其他) ，並由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。

七、投稿本期刊之稿件，不得投稿其他刊物。稿件經本期刊接受後，刊登權屬農試所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。

八、來稿經編審委員會審查合格後刊登，由本刊印贈抽印本 50 本；彩色頁印刷及抽印本加印費用由投稿人自行負擔。

九、其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

台灣農業研究

（原中華農業研究）

第五十六卷　第四期

中華民國九十六年十二月出版

發行人：林俊義

總編輯：安寶貞

主　編：方尚仁　黃淑華　蕭淑芬　楊舜臣

編審委員：

生技組：吳明哲（主審）

作物組：歐錫坤（主審）

呂秀英　黃肇家　楊純明　劉新裕

施昭彰　徐信次　劉政道

農化組：廖慶樑（主審）

郭鴻裕　簡宣裕

植病組：張清安（主審）

安寶貞　蔡武雄　鄧汀欽　謝廷芳

應動組：王清玲（主審）

陳炳輝　陳健忠　鄭　允　溫宏治

農機組：蔡致榮（主審）

黃禮棟　梁連勝

種原組：黃勝忠（主審）

農經組：潘德芳（主審）

另聘請各大學院校及研究機關相關學者專家擔任審查委員

Vol. 56, No. 4 Dec. 2007

JOURNAL
OF
TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

PUBLISHER: Lin, Chien-Yih

EDITOR IN CHIEF: Ann, Pao-Jen

EDITORS:

Fang, Shan-Jen   Huang, Shu-Hua   Shiau, Shu-Fen   Yang, Shen-Chen

EDITORIAL BOARD:

Chang, Chin-An (Plant Pathology)
Huang, Sheng-Chung (Crop Genetic Resources)
Liaw, Ching-Liang (Agriculture Chemistry)
Ou, Shyi-Kuan (Crop Science)
Pan, Te-Fang (Agriculture Economics)
Tsay, Jyh-Rong (Agriculture Engineering)
Wang, Chin-Ling (Applied Zoology)
Wu, Min-Tze (Biotechnology)

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

Chen, Bing-Huei   Chen, Chien-Chung   Cheng, Edward Yun
Chien, Shiuah-Yuh   Deng, Ting-Chin   Guo, Horng-Yuh
Hsieh, Ting-Feng   Hsu, Hsin-Tszu   Huang, Chao-Chia
Huarng, Li-Duhng   Liang, Lien-Sheng   Liou, Tsung-Dao
Liu, Sin-Yie   Lu, Hsiu-Ying   Shih, Jau-Chang
Tsai, Wu-Hsiung   Wen, Hung-Chich   Yang, Chwen-Ming

Reviewers of the related fields are also invited from universities and other research organizations

誌　謝

本學術期刊刊載農業研究成果報告，無論篇幅與內容上，均有明顯之成長與進步，深受國內外農業界支持。謹此，對今年參與本刊稿件評審工作的諸位評審委員（如下列；依姓名筆劃順序），表示誠摯之謝意與感激！

王自存	王清玲	王慶裕
申　雍	石正人	安寶貞
朱耀沂	吳明哲	呂秀英
李國譚	沈再木	沈偉強
林木連	林順福	林瑞松
邱義源	柯文雄	柳中明
胡澤寬	徐世典	高景輝
高靜華	涂金榮	張清安
曹幸之	許圳塗	陳仁炫
陳右人	陳良築	陳宗禮
陳政位	陳凱儀	彭金騰
曾彥學	曾夢蛟	黃文琪
黃勝忠	黃鵬林	楊世華
萬鐘汶	鄔宏潘	廖俊旺
歐錫坤	潘德芳	蔡東纂
蔡武雄	蔡致榮	蔡淑珍
蔡新聲	蔡龍銘	鄭清煥
盧煌勝	賴博永	謝兆樞
謝慶昌	簡立賢	顏志恆
顏昌瑞	顏國欽	嚴新富

台灣農業研究編審委員會謹上

台灣農業研究第五十六卷第四期

出 版 者：行政院農業委員會農業試驗所

發 行 人：林俊義

總 編 輯：安寶貞

地　　址：台中縣霧峰鄉萬豐村中正路一八九號

網　　址：htpp://www.tari.gov.tw

電　　話：(04)2330-2301～5

印 製 者：采京藝術印刷有限公司

地　　址：台中市西屯區河南路二段二六二號十三樓之九

電　　話：(04)2452-7929

出版日期：九十六年十二月三十一日

展 售 處：國定書坊台視總店　105台北市八德路三段10號

電話：(02)2578-1515

網址：http://www.govbooks.com.tw

五南文化廣場　400台中市中山路6號

電話：(04)2226-0330

Dec, 2007

Journal of Taiwan Agricultural Research

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Vol. 56, No.4

Research Reports

Use of Rice Blast Diseased Leaves for Preservation of *Pyricularia oryzae*
Lih-Jiuan Hsieh, Yih-Chang Chang, Chun-Wei Chen and Ting-Fang Hsieh......253

Comparative Analysis of Expressed Sequence Tag (EST) in Rice Induced by *Magnaporthe grisea*
Hsiu-Ying Lu, Yi-Chia Chiu, Cheng-Tao Chen, Meng-Li Wei and Chun-Tang Lu......261

Using RAPD Markers to Study Genetic Variation among Lychee Cultivars
Wen-Li Lee, Yung-Shing Teng and Rong-Quey Lin......281

Selection for Large Fruit of *Prunus campanulata* Maxim. Germplasm in Taiwan
Chia-Wei Song, Ming-Te Lu and Shyi-Kuan Ou......289

Effects of Rootstocks on Tree Growth, Yield and Fruit Quality of 'Murcott' Tangor
A-Shiarn Hwang and Shih-Cheng Hung......298

The Races of *Podosphaera xanthii* Causing Melon Powdery Mildew in Taiwan
Jin-Hsing Huang and Yu-Hwa Wang......307

Effects of Culture Media and Casing Materials on Fruiting Characteristics of *Coprinus comatus*
Jin-Tong Chen, Wei-Sung Li and Kaun-Tzer Wu......316

Genetic Diversity and Identification of Cassava Germplasm with RAPD and SSR
Shu Chen, Chung-Chen Fan and Chien-Yih Lin......327

Research Notes

New Forma of *Prunus campanulata* Maxim.
Ien-chie Wen......338

Contents for Volume 56......342

Index for Volume 56......346

Published by The Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture Taichung, Taiwan, Republic of China

行政院新聞局出版事業登記證局版臺省誌字第二九八號 中華郵政中臺字第〇三〇九登記為雜誌交寄

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

GPN 2009500560

定價：新台幣一七五元